



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Química Agrícola y Edafología

**TRIGO CLEARFIELD Y GRAMÍNEAS (*L. rigidum*) RESISTENTES
A IMIDAZOLINONAS. ASPECTOS FISIOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES.**

**CLEARFIELD WHEAT AND GRASS WEEDS (*L. rigidum*)
RESISTANT TO IMIDAZOLINONES. PHYSIOLOGICAL,
BIOCHEMICAL AND MOLECULAR ASPECTS.**

DOCTORANDO: Rafael Domínguez Méndez

DIRECTORES: Rafael De Prado Amián y Antonia M^a Rojano Delgado

TUTORA: Carmen Galán Soldevilla

PROGRAMA DE DOCTORADO: Recursos Naturales y Gestión Sostenible

Córdoba, Julio 2018

TITULO: *TRIGO CLEARFIELD Y GRAMÍNEAS (L. rigidum) RESISTENTES A
IMIDAZOLINONAS. ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y
MOLECULARES*

AUTOR: *Rafael Domínguez Méndez*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Química Agrícola y Edafología

**TRIGO CLEARFIELD Y GRAMÍNEAS (*L. rigidum*) RESISTENTES
A IMIDAZOLINONAS. ASPECTOS FISIOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES.**

Tesis Doctoral

Rafael Domínguez Méndez

Córdoba, 2018



TITULO DE LA TESIS:

TRIGO CLEARFIELD Y GRAMÍNEAS (*L. rigidum*) RESISTENTES A IMIDAZOLINONAS. ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES.

DOCTORANDO:

DON RAFAEL DOMÍNGUEZ MÉNDEZ

LOS DIRECTORES DE LA TESIS INFORMAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado **“TRIGO CLEARFIELD Y GRAMÍNEAS (*L. rigidum*) RESISTENTES A IMIDAZOLINONAS. ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES”**, constituye la Memoria que presenta **Don Rafael Domínguez Méndez** para aspirar al grado de Doctor en “Recursos Naturales y Gestión Sostenible”, habiendo sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba, bajo nuestra dirección y supervisión. Consideramos que el doctorando cumple los requisitos legales para optar al grado de Doctor en “Recursos Naturales y Gestión Sostenible”.

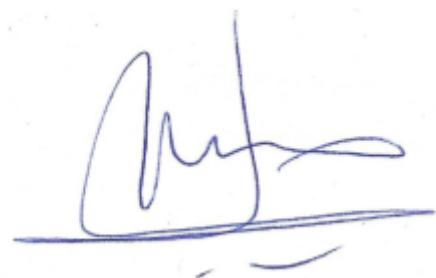
Trabajos publicados.

1. Domínguez-Méndez, R., Alcántara-De la Cruz, R., Fernández-Moreno, P., Aponte, R., De Prado, R. (2017). Multiple mechanism are involved in new imazamox-resistant varieties of durum and soft wheat. Scientific Reports 7(1); 14839.
2. Domínguez-Méndez, R., Alcántara-De la Cruz, R., Rojano-Delgado, A. M., Martins da Silveira, H., Portugal, J., Cruz-Hipolito, H. E., De Prado, R. (2017). Stacked traits conferring multiple resistance to imazamox and glufosinate in soft wheat. Enviado para su publicación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 2018

Directores:

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Rafael De Prado Amián', with a long horizontal stroke at the end.

Fdo: Rafael De Prado Amián

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Antonia Mª Rojano Delgado', with a long horizontal stroke at the end.

Fdo: Antonia Mª Rojano Delgado

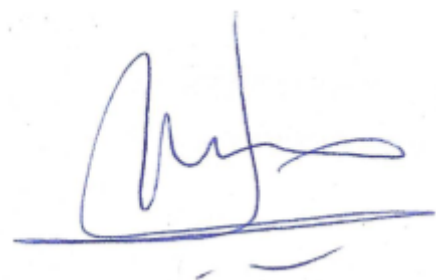
Tutora:

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Carmen Galán Soldevilla', with a long horizontal stroke at the end.

Fdo: Carmen Galán Soldevilla

**TRIGO CLEARFIELD Y GRAMÍNEAS (*L. rigidum*) RESISTENTES A
IMIDAZOLINONAS. ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y
MOLECULARES.**

Directores:



Fdo: **Rafael De Prado Amián**



Fdo: **Antonia Mª Rojano Delgado**

Tutora:



Fdo: **Carmen Galán Soldevilla**

Trabajo presentado para optar al grado de
Doctor en Recursos Naturales y Gestión Sostenible

Fdo: **Rafael Domínguez Méndez**

Licenciado en Ciencias Ambientales

Máster en Cambio Global: Recursos Naturales y Sostenibilidad

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría transmitir mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado y apoyado en la elaboración de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, mi agradecimiento a los directores del presente trabajo. Al Dr. Rafael De Prado Amián por ofrecerme la oportunidad de realizar el doctorado y transmitirme sus conocimientos para la elaboración del mismo, y a la Dra. Antonia M^a Rojano Delgado por toda su ayuda y confianza que han sido fundamentales para la realización de esta investigación.

A la Dra. Carmen Galán Soldevilla, tutora de la presente memoria, por haberme prestado su tiempo, dedicación y paciencia durante la elaboración de esta Tesis doctoral.

Me gustaría agradecer especialmente a la Dra. M^a José García del Rosal por su inigualable colaboración y valiosas aportaciones en biología molecular, que aunque breves han sido de gran ayuda.

A mis compañeros y amigos Rafa Roldán y Antonio por compartir sus experiencias a nivel del laboratorio, y a Manuel Molina y Bruno Alcalá del Departamento de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba, por compartir este tiempo con ellos.

Finalmente agradecer a mi familia porque sin su apoyo y comprensión, este trabajo no habría sido posible.

GRACIAS

“El día que el hombre se dé cuenta de sus
equivocaciones, se habrá acabado el
progreso de la ciencia”

Charles Chaplin

RESUMEN

El control de malas hierbas en trigo es uno de los principales objetivos de los agricultores para obtener mayores rendimientos, este manejo sin el uso de herbicidas es inconcebible en los sistemas convencionales de producción intensiva de trigo. Por ello, los cultivos resistentes a herbicidas ofrecen ventajas significativas para el control de malezas. En este trabajo se caracterizó el nivel de resistencia a imazamox de dos nuevas variedades de trigo llamadas Rafalín (*T. aestivum*) y Antoñín (*T. durum*), que se obtuvieron por mejoramiento convencional mediante tecnología Clearfield®. Además, se definieron los rasgos que confieren resistencia múltiple a imazamox + glufosinato de dos líneas de *T. aestivum* (Anza y Pantera). Los cultivares de *T. aestivum* se compararon con la variedad sensible Gazul, mientras que el cultivar de *T. durum* se realizó con su homólogo sensible Simeto. Los cultivares R fueron 93,7 (Rafalín) y 43,7 (Antoñín) veces más resistentes a imazamox, del mismo modo, Anza y Pantera fueron 15,1 y 27,9, respectivamente más resistentes a imazamox + glufosinato que sus respectivos cultivares S. La actividad de la enzima ALS reveló una alta resistencia a los herbicidas imidazolinonas (IMI) en cultivares R. La mutación Ser 653Asn que confiere resistencia a los herbicidas IMI se identificó en los genes *imi1* e *imi2* de Rafalín y Pantera y sólo en el gen *imi1* de Antoñín y Anza. La enzima GS de las plantas de trigo R y S fue igualmente sensible a glufosinato. Sin embargo, las plantas R presentaron una baja acumulación de amonio debido a la acetilización rápida del glufosinato a N-acetil-glufosinato por la enzima PAT, adquirida de la proteína parental resistente a glufosinato. Los patrones de absorción de ¹⁴C-imazamox y ¹⁴C-glufosinato fueron similares entre los cultivares R y S, mostrando que estos parámetros no estaban implicados en la resistencia. La diferencia de sensibilidad entre cultivares R (Rafalín y Antoñín) se debió a la cantidad de genes de resistencia que portan cada genotipo. Igualmente, la resistencia múltiple a imazamox + glufosinato encontrada en Anza y Pantera se debieron a alteraciones en el gen ALS y a una inactivación rápida del glufosinato a N-acetil-glufosinato. Por lo que los cultivares R podrían ser una excelente herramienta de control de malezas en la producción de trigo.

ABSTRACT

The control of weeds in wheat is one of the main objectives of farmers to obtain higher yields, this management without herbicide use is not conceivable in conventional intensive wheat production systems. Therefore, herbicide resistant crops offer significant advantages to weed control. In this work, the resistance level to imazamox of two new varieties of wheat called Rafalín (*T. aestivum*) and Antoñín (*T. durum*), that were obtained by conventional breeding using Clearfield® technology, was characterized. In addition, the stacked traits that conferring multiple resistance to imazamox + glufosinate of two lines of *T. aestivum* (Anza and Pantera) were defined. The cultivars of *T. aestivum* were compared with the susceptible variety Gazul, while the cultivar of *T. durum* was made with its sensitive counterpart Simeto. The R cultivars were 93.7-fold (Rafalín) and 43.7-fold (Antoñín) more resistant to imazamox, similarly, Anza and Pantera were 15.1 and 27.9, respectively more resistant to imazamox + glufosinate than their respective S cultivars. The acetolactate synthase (ALS) enzyme activity revealed high resistance to imidazolinone (IMI) herbicides in R cultivars. The Ser653Asn mutation that confers resistance to IMI herbicides was identified in the *imi1* and *imi2* genes of Rafalín and Pantera and only in the *imi1* gene of Antoñín and Anza. The GS enzyme of R and S wheat plants was equally sensitive to glufosinate. However, the R plants exhibited low ammonia accumulation due to the rapid acetylation of glufosinate to N-acetyl-glufosinate by the PAT enzyme, acquired from its glufosinate-resistant parent. The similar absorption patterns of ¹⁴C-imazamox and ¹⁴C-glufosinate between R and S cultivars showed that these parameters were not involved in the resistance. The differential sensitivity between R cultivars (Rafalín and Antoñín) was due to the number of resistance genes that carry each genotype. Likewise, the multiple resistance to imazamox + glufosinate found in Anza and Pantera were due to alterations in the ALS gene and a rapid inactivation of the glufosinate to N-acetyl-glufosinate. The R cultivars could be an excellent weed control tool in wheat production.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. El cultivo de trigo	13
1.1.1. Generalidades e historia del trigo	13
1.1.2. Condiciones ambientales para un buen desarrollo del trigo	14
1.1.3. Otros factores que favorecen el desarrollo del trigo	15
1.1.4. Variedades de trigo más utilizadas	15
1.1.5. Producciones de grano y superficies cultivadas de trigo	16
1.1.6. Morfología de la planta de trigo	18
1.1.7. Estadíos fenológicos y de muestreo del trigo	21
1.2. Importancia de las malas hierbas	27
1.2.1. Generalidades	27
1.2.2. <i>Lolium</i> spp	29
1.2.3. Importancia agronómica	29
1.2.4. Métodos de control	32
1.3. Herbicidas	35
1.3.1. Generalidades	35
1.3.2. Clasificación y modo de acción	37
1.3.3. Herbicidas Imidazolinonas	38
1.3.4. Inhibición de la enzima acetolactato sintasa (ALS)	39
1.3.5. Glufosinato	42
1.3.6. Actividad glutamino sintasa (GS) en plantas	43
1.4. Mecanismos de resistencia de las plantas a herbicidas	44
1.4.1. Definición resistencia-tolerancia	44
1.4.2. Mecanismos de resistencia	45
1.4.3. Desarrollo de cultivares resistentes a Imidazolinonas	50
1.4.4. Mecanismos de resistencia de trigo Clearfield a imidazolinonas	51
2. OBJETIVOS	53
2.1. Objetivo general	55
2.2. Objetivos específicos	55

3. MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.1. Material vegetal	59
3.2. Herbicidas utilizados y sus características	59
3.2.1. Imazamox	59
3.2.2. Glufosinato	60
3.3. Condiciones de crecimiento	62
3.4. Ensayos de dosis-respuesta	62
3.5. Estudio de retención foliar	63
3.6. Estudio de absorción y translocación de ^{14}C -imazamox y ^{14}C -glufosinato	64
3.7. Estudio del metabolismo de imazamox	65
3.8. Acumulación de amonio	66
3.9. Estudio de la actividad ALS	66
3.10. Estudio de la actividad GS	67
3.11. Estudio de mutaciones en el gen ALS	67
3.12. Análisis estadístico	68
4. RESULTADOS	69
4.1. Ensayos de dosis-respuesta	71
4.2. Estudios de retención foliar	73
4.3. Estudio de absorción y translocación de ^{14}C -imazamox y ^{14}C -glufosinato	74
4.4. Estudio del metabolismo de imazamox	79
4.5. Acumulación de amonio	81
4.6. Estudio de la actividad ALS	81
4.7. Estudio de la actividad GS	85
4.8. Secuenciación de la ALS	86
5. DISCUSIÓN	87
6. CONCLUSIONES	95
7. BIBLIOGRAFIA	99
8. ANEXO	121
9. CURRICULUM VITAE	161

ABREVIATURAS

ACCasa	Acetil Coenzima A carboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
AHAS	Acetohidroxiácido sintasa
ALS	Acetolactato sintasa
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosina trifosfato
BASF	Badische Anilin-und Soda-Fabrik
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Cit-P₄₅₀	Citocromo P ₄₅₀
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
DAD	Detector de diodos en fila
ECPA	European Crop Protection Association
ED₅₀	Dosis de herbicida capaz de reducir en un 50% el peso fresco de las plantas con respecto al control
EPSPS	Enol piruvato shikimato fosfato sintasa
EEUU	Estados Unidos de América
FAD	Flavín adenin dinucleótido
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
FR	Factor de Resistencia al herbicida
g	Gramo
GLU	Glufosinato
°C	Grados Centígrados
GS	Glutamina sintasa
h	hora
ha	Hectárea
HDT	Horas después del tratamiento
HETPP	Hidroxietiltiaminapirofosfato

HRAC	Comité de Acción Contra la Resistencia a Herbicidas
ia	Ingrediente activo
IAS	Instituto de Agricultura Sostenible
IC	Intervalos de confianza
I₅₀	Dosis de herbicida capaz de reducir en un 50% la actividad enzimática
IMA	Imazamox
IMI	Imidazolinonas
INIA	Instituto Nacional de Investigaciones y Tecnología Agraria y Alimentaria
Kb	Kilobase
KBq	Kilobecquerel
KPa	KiloPascal
L	litro
LSC	Líquido de centelleo
m	Metro
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
MCPA	Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
MPI	Manejo Integrado contra Plagas
μL	Microlitro
nm	Nanometro
PAT	Fosfinotricina-N-acetiltransferasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPT	Fosfinotricina
PTB	Pirimiditiobenzoatos
PVPP	Polivinilpirrolidona
RAIF	Red de Alerta e Información Fitosanitaria
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo

SCAI	Servicio Central de Apoyo a la Investigación
SCT	Sulfonil amino carbonil triazolinonas
SU	Sulfonilureas
t	Tonelada
TP	Triazolopirimidinas
TPP	Tiaminapirofosfato
UE	Unión Europea
UPD-glucosa	Uridina difosfato-glucosa
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
W	Vatio

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadíos de desarrollo del trigo. Escala Feekes y escala BBA (Feekes, 1941 y Aufhaammer et al., 1973).....	22
Tabla 2. Escala de desarrollo del trigo según Jonard (Jonard, 1951).....	22
Tabla 3. Producción real y perdidas (billones de dolares) estimadas en ocho cultivos, por plagas y región. (Haigh, 2000).....	30
Tabla 4. Clasificación de los herbicidas según su modo de acción. (HRAC, 2008).....	38
Tabla 5. Tres fases del metabolismo de plaguicidas (Shimakuburo, 1985; De Prado et al., 2004).....	47
Tabla 6. Parámetros de la ecuación sigmoideal utilizada para estimar la dosis de imazamox (g ai ha^{-1}) necesaria para reducir el peso fresco de una población en 50% (ED_{50}) en cultivares de trigo susceptibles y resistentes de trigo blando (<i>Triticum aestivum</i>) y duro (<i>Triticum durum</i>).....	72
Tabla 7. Parámetros de la ecuación sigmoideal utilizada para estimar la dosis (g ai ha^{-1}) de la mezcla imazamox (IMA) + glufosinato (GLU) necesaria para reducir el peso fresco en un 50% (ED_{50}) en líneas de <i>Triticum aestivum</i> susceptible y resistente.....	72
Tabla 8. Porcentaje de translocación de ^{14}C -imazamox en variedades de trigo duro (<i>Triticum durum</i>) y blando (<i>Triticum aestivum</i>) susceptibles y resistentes a imazamox. 75	
Tabla 9. Parámetros de la ecuación sigmoideal utilizada para estimar la concentración (μM) de herbicidas inhibidores de ALS necesarios para inhibir la actividad acetolactato sintasa en un 50% (I_{50}) en variedades de trigo blando (<i>Triticum aestivum</i>) y duro (<i>Triticum durum</i>) susceptibles y resistentes a imazamox.....	83
Tabla 10. Parámetros de la ecuación sigmoideal utilizados para estimar la concentración (μM) de imazamox necesario para inhibir la actividad enzimática de ALS en un 50% (I_{50}), en plantas sensibles y resistentes de trigo blando (<i>Triticum aestivum</i>).....	85
Tabla 11. Parámetros de la ecuación sigmoideal utilizados para estimar la concentración (μM) glufosinato necesario para inhibir la actividad enzimática GS en un 50% (I_{50}), en plantas sensibles y resistentes de trigo blando (<i>Triticum aestivum</i>).....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución mundial de Producción y Superficie cultivada de trigo. FAOSTAT, 2016 (FAO).....	16
Figura 2. Evolución europea de Producción y Superficie cultivada de trigo FAOSTAT, 2016 (FAO).....	17
Figura 3. Fases de desarrollo de un cereal siguiendo la escala decimal Zadoks (Zadoks et al., 1974).....	20
Figura 4. Ruta biosintética de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Coruzzi y Last, 2000).....	40
Figura 5. Herbicidas inhibidores de acetolactato sintasa (ALS) (Heap, 2002).....	42
Figura 6. Herbicidas inhibidores de la GS. Glufosinato y bialafos.....	43
Figura 7. Reacción de catálisis de la GS y su efecto en la biosíntesis de la asparragina.	43
Figura 8. Estructura del imazamox.....	60
Figura 9. Estructura química del Glufosinato.....	61
Figura 10. Curvas de dosis-respuesta de la reducción de peso fresco con respecto a las plantas control no tratadas de cultivares susceptibles y resistentes a imazamox de las diferentes variedades de trigo blando (<i>Triticum aestivum</i>) y duro (<i>Triticum durum</i>) evaluadas 30 días después del tratamiento.....	71
Figura 11. A) Curva de dosis-respuesta de la reducción del peso fresco respecto a las plantas de control no tratadas de diferentes líneas de trigo (<i>Triticum aestivum</i>), tratadas con mezclas de imazamox + glufosinato y evaluadas a los 21 días después del tratamiento.....	73
Figura 11. B) Plantas de trigo tratadas con 40 + 750 g ai ha ⁻¹ de imazamox y + glufosinato, respectivamente.....	73
Figura 12. Absorción de ¹⁴ C-imazamox en variedades de trigo blando (<i>Triticum aestivum</i>) y duro (<i>Triticum durum</i>) susceptibles y resistentes a imazamox.....	74

- Figura 13.** Visualización de ^{14}C -imazamox en plantas de trigo susceptibles y resistentes a imazamox a las 96 HDT. La mayor concentración de ^{14}C -imazamox se resalta en rojo. Las flechas indican la hoja tratada..... 76
- Figura 14.** Absorción de ^{14}C -imazamox en plantas susceptibles y resistentes de trigo (*Triticum aestivum*) desde las 3 a las 96 h después del tratamiento (HDT). Barras verticales \pm error estándar (n = 5)..... 77
- Figura 15.** Visualización de ^{14}C -imazamox a las 96 HDT. La mayor concentración de ^{14}C -imazamox se resalta en rojo. Las flechas indican la hoja tratada.....77
- Figura 16.** Translocación de ^{14}C -imazamox de la hoja tratada al resto de la planta y raíces desde las 3 a las 96 HDT..... 78
- Figura 17.** Absorción de ^{14}C -glufosinato desde las 3 a las 96 HDT. Las barras verticales representan \pm error estándar (n = 5)..... 78
- Figura 18.** Visualización de ^{14}C -glufosinato a las 96 HDT. La mayor concentración de ^{14}C -glufosinato se resalta en rojo. Las flechas indican la hoja tratada..... 79
- Figura 19.** Translocación de ^{14}C -glufosinato de la hoja tratada al resto de la planta y raíces desde las 3 a las 96 HDT. Las barras verticales representan \pm errores estándar (n = 5)..... 79
- Figura 20.** Metabolismo de Imazamox en variedades de trigo blando (*Triticum aestivum*) y duro (*Triticum durum*) tratadas a dosis de campo (40 g ai ha^{-1} imazamox) a las 96 HDT. Las barras indican la desviación estándar de la media (n = 3)..... 80
- Figura 21.** Acumulación de amoníaco (%) a diferentes concentraciones de glufosinato (μM) en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) susceptibles y resistentes. Barras verticales \pm error estándar (n = 3)..... 81
- Figura 22.** Curvas de reducción de actividad ALS (%) de cinco familias inhibidoras de ALS en plantas susceptibles y resistentes a imazamox de las variedades de trigo blando (*Triticum aestivum*) y duro (*Triticum durum*)..... 82
- Figura 23.** Curvas de actividades enzimáticas ALS en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) susceptibles y resistentes..... 84

- Figura 24.** Curvas de actividades enzimáticas GS en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) susceptibles y resistentes. Barras verticales \pm error estándar ($n = 3$)..... 85
- Figura 25.** Alineamiento parcial de las secuencias de aminoácidos para los genes *imi1*-ALS e *imi2*-ALS de los cultivares susceptible y resistentes a imazamox de las diferentes variedades de trigo blando (*Triticum aestivum*) y duro (*Triticum durum*)..... 86

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cultivo de trigo

1.1.1. Generalidades e historia del trigo

El trigo (*Triticum* spp.) es el conjunto de cereales, tanto cultivados como silvestres, que son plantas anuales de las familias de las gramíneas (*Poaceae*). La palabra trigo designa tanto a la planta como a sus semillas comestibles, tal y como ocurre con los nombres de otros cereales. Su origen léxico proviene del latín *triticum*, que significa quebrado, triturado o trillado, haciendo referencia a la actividad que se debe realizar para separar el grano de trigo de la cascarilla que lo recubre.

El trigo, junto con el arroz y el maíz, son los tres tipos de granos de mayor producción y consumo por el hombre desde la antigüedad, por contribuir sustancialmente a la nutrición humana, aunque gran parte también se destina a la alimentación animal. Como dato interesante cabe notar que cada mes del año una cosecha de trigo madura en algún lugar del mundo (González-Torres, 2007).

Se cree que este cereal tuvo su origen alrededor del 10.000 a.C. en la antigua Mesopotamia, gracias a las buenas cualidades de esta zona, muy rica en nutrientes y con buena irrigación proveniente de los ríos Tigris y Eufrates (Scott, 2013). Los trigos recolectados fueron probablemente *Triticum monococcum* y *Triticum dicoccum* los cuales poseían ciertas cualidades negativas como la fragilidad durante la maduración y la permanencia de las envueltas o glumillas en el grano (Hejtmánková et al., 2010; López-Bellido, 1991).

Desde Oriente Medio el cultivo del trigo fue difundido al resto del mundo, se introdujo en la civilización del Antiguo Egipto, cultivándose en el Valle del Nilo, y de allí a la griega y romana, siendo de esta última de donde surge la palabra “cerealis”, ya que la diosa de la agricultura en la mitología romana era “Ceres”.

Dentro de las principales o más importantes áreas de expansión del trigo se encuentra la Cuenca Mediterránea, que podría haber jugado, según algunos autores, un papel importante en la diferenciación de los trigos y, en particular, del trigo duro. A partir del 4000 a. C. el cultivo se extendió por la península Ibérica, destacando las zonas del Valle del Duero occidental, regiones lusitánicas y bajo Guadalquivir (López-Bellido, 1991).

El trigo, como se ha comentado anteriormente, es un cereal que pertenece al orden Graminales, familia *Graminae* (actualmente denominada *Poaceae*), subfamilia *Festucoideae*, tribu *Triticaceae*, género *Triticum*, especie *T. aestivum*. La característica genética que unifica a todas las especies del género *Triticum*, es que su número cromosómico es múltiplo de 14. Los trigos se clasifican de acuerdo a su número de cromosomas, agrupándolos de manera general en tres series: Diploides con 14 cromosomas y genoma AA ($2n=2x=14$), Tetraploides con 28 cromosomas y genoma AABB ($2n=4x=28$) y hexaploides con 42 cromosomas y genoma AABBDD ($2n=6x=42$), siendo $x=7$ el número básico de cromosomas (Kimber y Sears, 1987).

Hoy en día, el desarrollo de nuevas variedades, el empleo de fertilizantes y plaguicidas han hecho aumentar extraordinariamente la producción de trigo, llegando a observarse en todo el Mundo.

1.1.2. Condiciones ambientales favorables para un buen desarrollo del trigo

Como más importantes vamos a citar los requisitos exigidos respecto a las siguientes condiciones ambientales:

- Temperatura: Abarca un rango desde 3 °C de mínima a 30-33 °C de máxima, siendo una temperatura óptima la comprendida entre los 10 y los 25 °C (Rawson y Gómez-Macpherson, 2001).
- Humedad: Requiere una humedad relativa entre el 40-70% desde el espigamiento a la cosecha que es cuando tiene mayores requerimientos, ya que exige unos niveles entre 50-60 % y un clima seco para su maduración.
- Pluviometría: Aunque un trigo puede desarrollarse con aportaciones de agua de entre 250 y 2800 mm/ciclo, el 75% de los trigos crecen correctamente con aportes de agua de entre 375 y 800 mm/ciclo. Situándose el óptimo entre 400-500 mm/ciclo.
- Suelo: Los mejores suelos para su crecimiento son los de textura entre franca y franco-arcillosa, profundos, con un buen potencial nutritivo, libre de inundaciones y un pH que oscile entre valores de 6 a 7,5.

1.1.3. Otros factores que favorecen el desarrollo del trigo

En la actualidad la rotación de cultivos es considerado como uno de los principales sistemas de manejo. La importancia de la rotación de cultivos radica en varios aspectos, dentro los cuales se destacan: Control de plagas y enfermedades, control de malezas, aumento de los nutrientes residuales en el suelo y aumento de la sustentabilidad agrícola.

Cuando se cultiva trigo es muy recomendable, ya que al poseer una raíz fasciculada, no prospecta a grandes profundidades, donde se acumulan nutrientes que son aprovechables para otras cosechas. Las rotaciones más habituales en nuestras condiciones climáticas son con girasol, garbanzo, habas, sorgo y lupino principalmente.

1.1.4. Variedades de trigo más utilizadas

En general su cultivo se hace desde latitudes de 60° N hasta 45° S, en un rango altitudinal que oscila desde pocos metros hasta más de 3000 metros sobre el nivel del mar. Existen un gran número de variedades, dentro de las cuales se van a citar las más extendidas:

- *Triticum aestivum* (trigo candeal), es el empleado para hacer harinas gracias a su alto valor nutricional, siendo la variedad más extendida en el mundo. Se trata de una especie hexaploide.
- *Triticum compactum* (trigo semiduro), aunque antiguamente se utilizaba en harinas, su bajo contenido en gluten y proteína, que le confiere un bajo valor nutritivo, ha hecho que se destine a la fabricación básicamente de galletas. También se trata de una variedad hexaploide.
- *Triticum durum* (trigo semolero), se utiliza para fabricar pastas y sémola de cuscús por poseer un alto valor nutritivo (alto contenido en gluten y proteína). Es una variedad tetraploide.

Finalmente, otras variedades de menor utilización o casi extintas y que podemos resaltar son:

- *Triticum spelta* (escaña mayor o escanda mayor), que es hexaploide y se utiliza para la preparación de alimentos vegetarianos.
- *Triticum dicoccoides* (trigo almidonero silvestre), que es tetraploide y que fue el más importante para la humanidad en la antigüedad, actualmente sólo se cultiva en algunas regiones de España y la India.

1.1.5. Producciones de grano y superficies cultivadas de trigo

El trigo es adaptable a condiciones diversas, desde las xerofíticas, hasta las de la costa. Las variedades cultivadas que son de muy diferente genealogía y crecen bajo condiciones de suelo y clima muy variados, muestran características muy diversas (Hinrichsen et al., 1997; Plana, 2013).

Dicha adaptabilidad a distintos climas y tipos de suelo queda evidenciada en la distribución del trigo en el mundo, cultivado en todos los continentes (excepto en la Antártida) en mayor o menor extensión (Matz, 1991), aunque el área de mayor importancia es la zona templada del hemisferio norte.

La producción cerealista en el mercado mundial sigue aumentando cada año según estimaciones de la FAO (2017) (Figura 1). La producción de cereal se concentra además de la UE, en Estados Unidos, Canadá, Australia, Ucrania, Kazajistán y Argentina (Comisión Europea, 2017), mientras la producción de trigo se concentra principalmente en la Unión Europea (Figura 2), China, India, Rusia y Estados Unidos suponen un 20,7%; 17,6%; 13,4%; 8,2% y 7,7% respectivamente para la campaña 2015/2016 (USDA, 2016).

El trigo es el tercer cereal en cuanto a producción mundial, aunque el primero en lo que se refiere a superficie cultivada e intercambios comerciales (Rodríguez-Rivera y Simón-Magro, 2008).

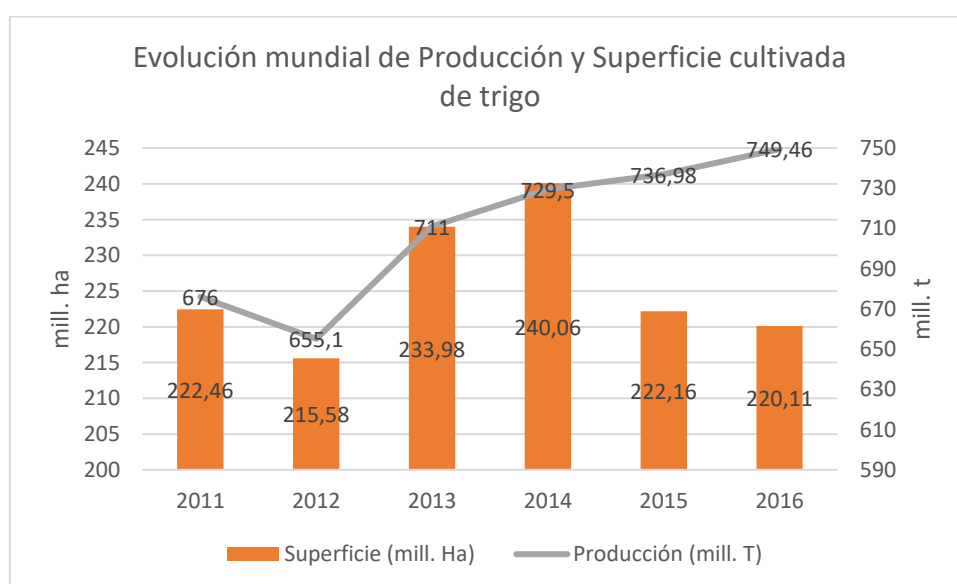


Figura 1. Evolución mundial de Producción y Superficie cultivada de trigo. FAOSTAT, 2018 (FAO).

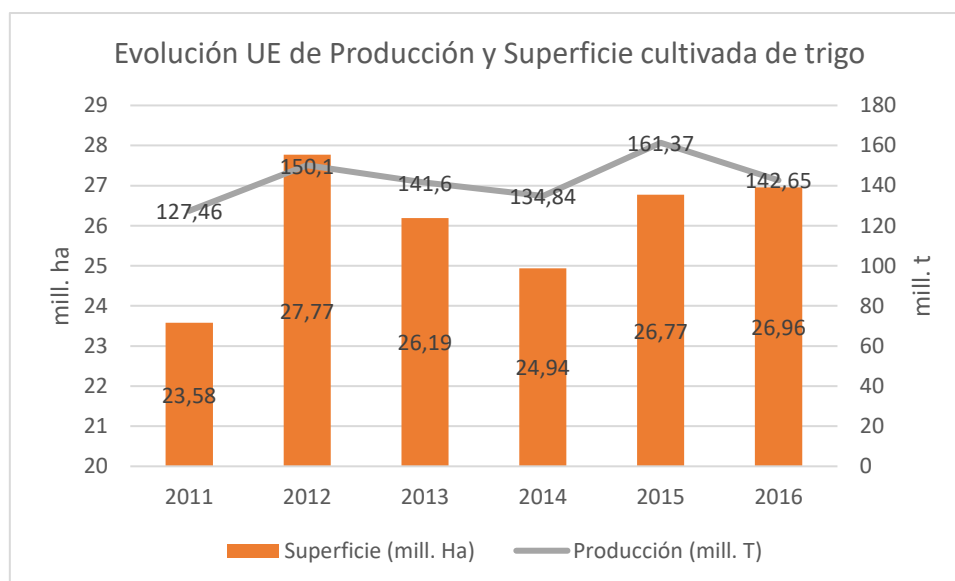


Figura 2. Evolución en la UE de Producción y Superficie cultivada de trigo FAOSTAT, 2018 (FAO).

La producción de trigo puede verse limitada por el manejo del cultivo, las condiciones ambientales y los sistemas biológicos externos que interfieren y causan una disminución del rendimiento.

El desarrollo de la planta puede verse afectado por una serie de causas de origen parasitario (ataque de un ser vivo como plantas, animales, bacterias, hongos o virus), abiótico (agentes meteorológicos, toxicidad del suelo, etc.) y/o competitivo (competencia con otras especies).

En trigo, los ataques por parte de paulilla, garrapatillo o sampedrito (géneros *Aelia* y *Eurigaster*) son muy importantes en algunas regiones españolas. Atacan la espiga y destruyen el gluten generando harinas de peor calidad. El cultivo también se puede ver afectado por enfermedades que afectan a la parte aérea de la planta y que se desarrollan a partir de un ataque de hongos, siendo las royas y la *Septoria* las más comunes. El “Mal del pie” (*Ophiobolus graminis*) puede atacar a las raíces y, según el momento y su incidencia, matar a la planta (Guerrero, 1977). Otra causa de pérdidas son las que constituyen aves y roedores que se alimentan del grano del cultivo.

En todo caso, si existe un factor que afecta realmente a estos cultivos, a su desarrollo y sobre todo al rendimiento final del grano, es la competencia con especies de malas hierbas (Davies y Welsh, 2002; Torner et al., 1999).

1.1.6. Morfología de la planta de trigo

La planta de trigo es de porte herbáceo, pudiendo alcanzar incluso hasta 150 cm de altura en el momento de la madurez. En relación a su morfología, se pueden distinguir el sistema radical y el sistema aéreo (Horovitz, 1939).

- Sistema radicular.

Está compuesto de:

- *Raíces primarias o seminales*: Que son las primeras que aparecen cuando tiene lugar la germinación hasta el comienzo del ahijado.
- *Raíces secundarias o adventicias*: Sustituyen a las seminales de forma progresiva. Nacen del nudo de ahijamiento, apareciendo cuando la planta emite sus tallos (López-Bellido, 1991). Son de tipo fasciculado con desarrollo superficial. El número de raíces adventicias presenta una relación muy estrecha con los tallos herbáceos efectivos.

El trigo mantiene el 50% de las raíces en los primeros 20-25 cm, pudiendo llegar hasta un metro, cuyo crecimiento comienza en el periodo de ahijado y su desarrollo se considera completo al final del encañado.

La capacidad de elongación y ramificación de las raíces está influenciada por las condiciones del medio, tales como humedad, temperatura, textura y fertilidad del suelo (Lersten, 1987; López Bellido, 1991). Así, mientras un exceso de agua invernal puede ralentizar su crecimiento, un déficit hídrico moderado puede activarlo. Temperaturas del orden de 10-15 °C favorecen la emisión de las raíces en los cereales de invierno, reduciéndose cuando la temperatura es inferior a 6-8 °C (Kirby y Appleyard, 1984; Simmons, 1987; López Bellido, 1991).

- Sistema aéreo

El sistema aéreo en la planta de trigo al igual que en los demás cereales, está formado por tallos que parten de una zona situada en la base de la planta, que se denomina nudo de ahijamiento. Cada tallo o vástago porta las hojas, acabando su extremo en la inflorescencia.

- *Tallos*: Están formados por nudos y entrenudos. Los primeros son zonas meristemáticas a partir de las cuales se alargan los entrenudos y se diferencian las hojas. El tallo es hueco (caña) y la resistencia al encamado dependerá de su altura y solidez. El entrenudo es la parte del tallo entre dos nudos, su número en tallos portadores de espigas oscila entre 5 y 9. Los de la base del tallo son más cortos. Su longitud, la cantidad de esclerenquima, y el número de haces vasculares, condiciona la resistencia a la caída fisiológica (encamado), aunque en ello también intervienen otros factores, como los genéticos, ambientales o la nutrición nitrogenada, siendo esta última un punto a tener en cuenta durante el ahijado, ya que en cereales de invierno, favorece más el alargamiento de los entrenudos de la base. Por el contrario, si el aporte es durante el encañado se favorece la elongación de los entrenudos superiores (Reilly, 1990).
- *Hojas*: Se disponen alternas en dos filas a lo largo del tallo. Cada hoja consta de dos partes, la vaina o zona inferior que envuelve al entrenudo y el limbo o zona superior. Las vainas están sujetas al nivel del nudo, encajándose cuando son jóvenes unas con otras en torno al tallo, desuniéndose al crecer los entrenudos. En la unión del limbo y la vaina existe una pequeña lámina membranosa no vascular, denominada lígula y cuya misión es impedir que la lluvia o los insectos puedan alcanzar los tejidos meristemáticos de la base de la vaina. A cada lado de ésta, en la base del limbo, se encuentran dos pequeñas estípulas o aurículas, más o menos abrazadoras y vellosas. Las hojas son cintiformes, paralelinervias y terminadas en punta. Poseen vaina, lígula y aurículas bien definidas.
- *Inflorescencia*: En los cereales hay dos tipos de inflorescencias, en espiga (trigo, cebada y centeno); y en panícula (avena, arroz y sorgo). En ambos casos la unidad morfológica básica es la espiguilla. Esta espiguilla está envuelta en dos glumas unidas al eje principal de la inflorescencia o raquis en el caso de la inflorescencia en espiga, o a una de las ramificaciones laterales en el caso de panícula. Cada espiguilla presenta diversas flores, de las cuales aborta la mayor parte. La flor es hermafrodita y consta de un pistilo y tres estambres, y está protegida por dos brácteas verdes o glumas, la exterior se puede prolongar en una arista en algunos trigos. El número de flores fértiles por espiguilla varía según la especie, siendo de

2 a 5 en trigos harineros y de 2 a 4 en trigos duros. La fecundación y maduración del óvulo produce el grano de trigo, un fruto de tipo cariósipide.

- *Semilla*: El grano consta tanto de envolturas externas: pericarpo, mesocarpo y epicarpo; como de envolturas internas: testa, endospermo y germen. El conjunto de pericarpo y testa es lo que se conoce como salvado. El fruto del trigo, denominado cariósipide, es un fruto monospermo, seco e indehisciente, donde los tegumentos del ovario están estrechamente soldados al endospermo.

El ciclo de vida de la planta de trigo finaliza con la madurez. A lo largo del ciclo de la planta se distinguen distintas fases, que comprenden desde la germinación hasta la madurez fisiológica del trigo que se pueden describir siguiendo la escala de Zadoks et al., 1974) (Figura 3).

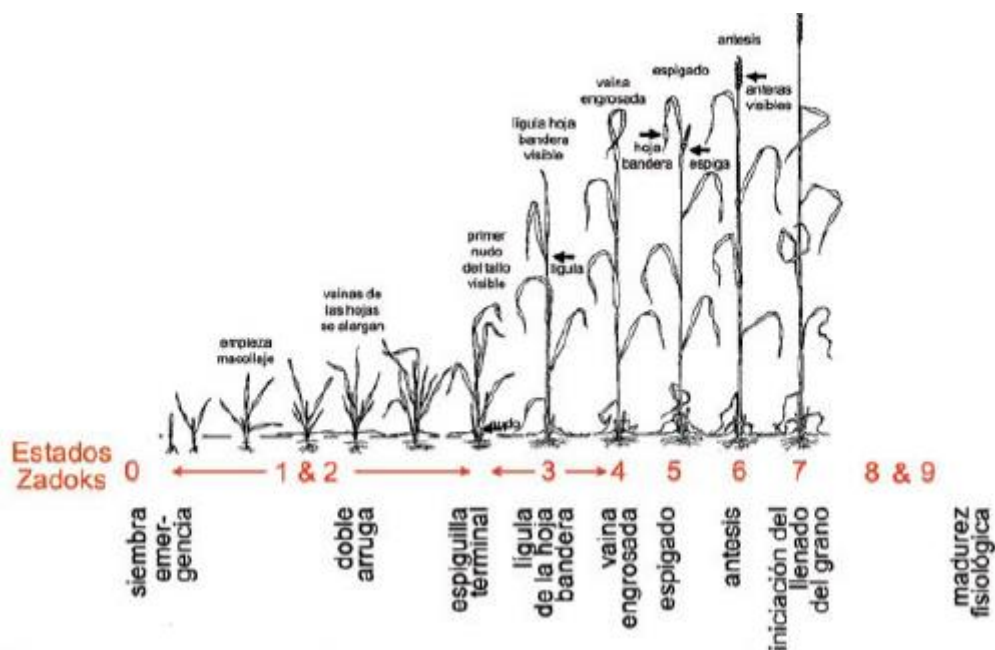


Figura 3. Fases de desarrollo de un cereal siguiendo la escala decimal Zadoks (Zadoks et al., 1974).

1.1.7. Estadíos fenológicos y de muestreo del trigo

Estadíos fenológicos

El estudio del trigo, al igual que el de otras plantas se realiza durante todo el ciclo vegetativo, debido al distinto ritmo de absorción y translocación de nutrientes por el cultivo, así como la distinta respuesta del mismo a la adición de fertilizantes y a los cambios ambientales producidos a lo largo del ciclo vegetativo.

Dado que el trigo es un cultivo muy estudiado por su importancia durante siglos en el campo de la alimentación, existen diversas clasificaciones, algunas más detalladas que otras, que tratan de definir los diferentes periodos característicos del ciclo vegetativo, es decir, los distintos estadíos fenológicos.

Asimismo, podemos encontrar tres periodos en el crecimiento de los cereales:

1. *Periodo vegetativo*: Crecimiento vegetativo que va desde la germinación hasta el final del ahijado o inicio de la floración.
2. *Periodo reproductivo*: Crecimiento de los órganos reproductivos, que va desde el encañado hasta la fecundación.
3. *Periodo de maduración*: Formación del fruto, desde la fecundación hasta la maduración de la semilla.

A continuación, se muestran tres de estas escalas, presentándose en la tabla 1 dos clasificaciones, la definida por Feekes (1941). Esta escala aparece citada por Large (1954) por lo que en algunos textos aparece como escala de Feekes-Large. En esta primera tabla aparece también la escala BBA (Aufhaammer et al., 1973). Existen otras escalas, como la escala de Jonard (1951), representada en la tabla 2.

Tabla 1. Estadíos de desarrollo del trigo. Escalas de Feeks y BBA (Feeks, 1941 y Aufhaammer et al., 1973).

Escala Feekes	Escala BBA	
1	A	Germinación
1	B	Estadío 1 hoja
1	C	Estadío 2 hoja
1	D	Estadío 3 hoja
2	E	Comienzo del ahijamiento
3	F	Ahijamiento principal
4	G	Fin de ahijamiento
5	H	Comienzo del encañado
6	I	Estadío de un nudo
7	J	Estadío de dos nudos
8	K	Aparición de la última hoja
9	L	Estadío de lígula
10	M	Apertura de la última vaina foliar
10,1	N	Comienzo del espigado
10,5	O	Final del espigado
10,5	P	Comienzo de la floración
10,5	Q	Final de la floración
10,8	R	Formación del grano
10,8	S	Madurez lechosa
10,8	T	Madurez pastosa
11	U	Madurez amarilla
11	V	Madurez completa
11	W	Madurez de muerte

Tabla 2. Escala de desarrollo del trigo según Jonard (Jonard, 1951).

Periodos	Fases		Fenómenos
Vegetativo	Germinación-nascencia		Salida de la primera hoja.
	Nascencia-Ahijamiento	Preahijamiento	Tres hojas. Cinco o seis raíces primarias.
		Ahijamiento	Formación del nudo de ahijamiento. Desarrollo de raíces secundarias. Aparición del primer esbozo de espiga.
	Ahijado-encañado		Formación de tallos herbáceos.
Reproductivo	Encañado		Efecto positivo sobre el peso de materia seca y negativo en la formación de tallos portadores de espigas.
	Espigado		Diferenciación de estigmas. Elaboración de las $\frac{3}{4}$ partes de materia seca. Organización de las espiguillas; fertilidad; fecundación y floración.
	Maduración de óvulos		Engrosamiento del grano. Amarilleamiento de la planta. Elaboración de la materia seca.
Maduración	Maduración		Fin de la fotosíntesis. Hinchamiento del grano. Desecación.

1. Periodo vegetativo

Dentro del periodo vegetativo podemos encontrar las siguientes fases:

a) Germinación

El grano de trigo germina cuando se dan una serie de condiciones en la semilla y en el medio.

La semilla debe encontrarse viva, es decir, no haber sobrepasado un periodo de 4 a 10 años, en el que se mantiene la facultad germinativa, dependiendo de la variedad y condiciones en que se encuentre el grano. Además, debe tener íntegro el embrión y los contenidos de las reservas del grano han de encontrarse dentro de unos límites; también deben de estar maduras fisiológicamente, es decir, han de contener un % de humedad comprendido entre el 11-25%.

Asimismo, las condiciones ambientales de temperatura óptima se encuentran entre 20 y 22 °C. Aunque la germinación se puede dar a temperaturas ligeramente superiores a 0 °C de forma más lenta, debe haber aireación para que no se asfixie el grano y la humedad del suelo debe encontrarse en un rango que oscile entre 60-80 %.

En estas condiciones se da el paso del estado de vida latente a vida activa, produciéndose en primer lugar, una absorción de agua (25 % del peso del grano) que permite la disolución de los elementos metabolizantes. Los tegumentos se desgarran al absorberse el agua y se producen los primeros intercambios respiratorios. La raíz principal aparece cubierta de una ligera envuelta o coleoriza, a la vez que aparece el coleóptilo, que recubre la plúmula, protegiéndola. La plántula puede tomar alimentos del suelo una vez desarrolladas las raíces primarias, cuando se agoten las reservas del grano.

La germinación incluye hasta la aparición de las tres primeras hojas y la formación del nudo de ahijamiento.

b) Ahijamiento

Surge la cuarta hoja y el nudo de ahijamiento se ensancha, como si estuvieran 4 ó 5 nudos juntos, de cada uno de los cuales saldrá una hoja. En la axila de cada una de estas hojas surgirá a partir de la yema axilar un tallo secundario. Las raíces secundarias que surgen de la base del nudo de ahijamiento que se alarga, crecen y se desarrollan.

A partir de la cuarta hoja surgirá un brote hijo. El incipiente tallo se forma y crece desarrollando en algunos casos, yemas axilares que producirán tallos secundarios que darán lugar a brotes herbáceos o espigas tardías. La espiga comienza a diferenciarse al iniciar el periodo y durante el mismo se irán distinguiendo las espiguillas por los estrangulamientos que se producen en el cono formador de la espiga. El periodo de ahijamiento se considera finalizado cuando se diferencian las glumas de las espigas. La importancia de este periodo depende de la variedad, las condiciones del medio, la forma de cultivo y la fertilización.

El ahijamiento es un periodo clave en el rendimiento, puesto que un ahijamiento pobre da un rendimiento bajo, a la vez que aumenta la cantidad de malas hierbas. Aunque tampoco un ahijamiento exagerado es recomendable, debido a que las espigas no se desarrollan bien, produciéndose espigas tardías y raquílicas, aumentando así la sensibilidad a las enfermedades parasitarias, aún estando condicionadas por la humedad y temperatura.

2. Periodo reproductivo

Asímismo, dentro del periodo reproductivo encontramos las siguientes fases:

a) Encañado

Comienza al final del ahijamiento, cuando unos tallos herbáceos evolucionan hasta terminar rematados por espigas, mientras que otros retrasan su crecimiento hasta detenerlo. Los tallos portadores de espigas absorben las sustancias nutritivas muriéndose los restantes por carecer de nutrición.

Se considera el segundo periodo crítico en el desarrollo de la planta, y tiene una duración de unos 30 días, por lo que la fertilización es muy importante, ya que la planta crece rápidamente. En estas condiciones normales de nutrición la proporción de tallos portadores de espigas está en relación inversa a la temperatura, mientras que la materia seca está en relación directa.

b) Espigado

Definido por Maume y Dulac (1942) como “el periodo que comienza cuando la espiga aparece fuera de la vaina y termina cuando la espiga está completamente liberada”. Es el periodo de más rápido crecimiento, la planta elabora las $\frac{3}{4}$ partes de su materia seca entre

el ahijamiento y la floración. Su duración depende de la variedad y de las condiciones del medio.

Dependiendo de la temperatura se producirá un mayor o menor número de espiguillas y flores fértiles, debido a que a altas temperaturas la planta dedica parte de su actividad a la evapotranspiración.

c) Floración

La floración está marcada por la salida de los estambres fuera de la espiguilla. Finaliza la etapa cuando todos los estambres han salido. El comienzo de la floración está indicado por las salidas de las glumas de los estambres de las flores más desarrolladas con las anteras vacías de polen. La floración seguida de la fecundación marca el fin del periodo crítico esencial de la nutrición.

Hay que señalar que algunos autores no hacen distinción del periodo de floración, considerándolo incluido dentro del espigado. En numerosos trabajos publicados se habla de antesis, como un estadio fenológico, que se define como el periodo que abarca desde el final del espigado al final de la floración (Estado 10,5 Feekes).

3. Periodo de maduración

Este periodo es el último del ciclo vegetativo del trigo y está caracterizado por la acumulación de almidón en el grano, procedente de la fotosíntesis de las hojas todavía activas y de la espiga. Se produce también una movilización de glúcidos y proteínas hacia la espiga influenciada esta por las condiciones ambientales, ya que, en presencia de altas temperaturas y fuerte viento el agua disponible para la mitigación se ve perjudicada y el grano se arruga (fenómeno de asurado).

Por otra parte, hay que considerar las tres etapas de formación del grano:

- *Multiplicación celular activa*: El grano crece rápidamente. Aumenta en volumen y su peso en agua y materia seca hasta alcanzar el tamaño definitivo.
- *Acumulación de carbohidratos y proteínas*: Su peso en agua es constante, 40-50 % peso seco.
- *Desección*: Pérdida de agua del grano. La humedad desciende hasta el 14 % alcanzando la madurez para poder ser recolectado.

En zonas con pluviometría alta puede verse favorecido el rendimiento efectuando una aplicación tardía de N, con el objetivo de que la actividad funcional de las últimas hojas se vea prolongada.

Estadíos de muestreo

No se pueden definir, *a priori*, unos estadíos de muestreo generalizados para todo tipo de análisis, puesto que, dependerá de la finalidad del mismo. No obstante, hay una serie de consideraciones que hay que tener en presentes en todos los casos.

Se ha comprobado experimentalmente la importancia de la fecha de toma de muestra, dentro de un mismo periodo, observándose variaciones acusadas en la composición química de muestras tomadas en diversas fechas en un periodo. Por tanto, es esencial hacer la toma de muestra en estadíos fisiológicos idénticos, con el fin de poder comparar los resultados.

El muestreo de toda una planta, que por supuesto, posee tallos de distintas edades, daría resultados poco precisos. Es conveniente tomar tallos de la misma edad, esencialmente tallos principales, esto es fácil en el periodo de espigado, donde la diferencia entre tallos principales y secundarios es clara, no ocurriendo lo mismo en el ahijamiento.

Los estudios sobre el desarrollo de la planta, la producción de materia seca y la producción mineral a lo largo del ciclo vegetativo, deben hacerse a partir de las muestras tomadas en sus estados precisos, ya que el contenido en macronutrientes (N, P y K) disminuye en los cereales durante el crecimiento, por lo cual, es importante que el muestreo se realice en el estadio de crecimiento más adecuado posible para que la interpretación sea fiable.

El ahijamiento (3 en escala Feekes) es un periodo poco utilizado para el análisis vegetal, aunque sea crítica su influencia sobre la composición foliar, si bien, es esencial su análisis debido a que la detección de deficiencias en la nutrición a lo largo del mismo pueden ser corregidas. El muestreo en este periodo se hace generalmente sobre la totalidad de la parte aérea. El encañado no da lugar, usualmente, a muestreos aislados, aunque su estudio sea imprescindible en los trabajos que se realicen sobre la producción de materia seca y composición durante el ciclo.

Para un análisis vegetal de la planta entera hay diversas opiniones en cuanto al momento en que se debe realizar, oscilando entre el estadio 10 de Feekes (apertura de la última

vaina foliar) y 10,1 (comienzo del espigado), este último debe expresar los defectos nutricionales susceptibles de afectar el rendimiento final. El espigado (10,3 Feekes), también se utiliza para este fin, ya que dará una idea del estado de la nutrición de la planta en el momento de la floración.

En la floración del trigo de invierno, la planta ha absorbido entre el 70-80% de N, 65-75% de P y 95-100% de K, por lo que la composición química de la planta en este estado es imprescindible en los estudios de nutrición mineral y de diagnóstico foliar. Por esto, en los últimos estadios fenológicos del cultivo no se suelen hacer muestreos foliares, ya que no habría tiempo para corregir las posibles deficiencias nutricionales.

1.2. Importancia de las malas hierbas

1.2.1. Generalidades

El concepto de “mala hierba” puede diferir en función del punto de vista que se tome en consideración, es un concepto antropocéntrico y muy subjetivo. Un ejemplo de esta subjetividad lo encontramos en *Lolium* spp. o “ray-grass”. Esta especie es un cultivo importante en una amplia zona de Estados Unidos, siendo a su vez una especie competidora en cultivos de trigo en Chile, Francia o España.

Son principalmente tres los puntos de vista a tener en cuenta a la hora de definir el concepto de “mala hierba”:

- Antropocéntrico: Este punto de vista antepone los intereses del hombre. Así, mala hierba sería aquella que interfiere negativamente en los intereses objetivos del hombre, ya sea porque no tiene uso (o no ha sido aún descubierto), por tener características desagradables o por competir con otra planta cuya producción se persigue.
- Ecológico: Este criterio se basa en características comunes observadas en especies que muestran de forma repetida un comportamiento invasivo de las zonas cultivadas.
- Mixto: En este caso se consideran los dos criterios anteriores.

Atendiendo a los diferentes criterios, una posible definición del término “mala hierba” podría ser la que ofrecieron en su momento y que sigue en la actualidad Pujadas y Hernández (1988): “aquella planta que crece siempre o de forma predominante, en situaciones marcadamente alteradas por el hombre y que resulta no deseable por él en un lugar y un momento determinados”.

De acuerdo a lo anterior, de las aproximadamente 250.000 especies vegetales que existen a nivel mundial, solamente un 3% están consideradas como malas hierbas, es decir, unas 75.000 especies. Sin embargo, solamente unas 250 son reconocidas como malas hierbas problemáticas en los cultivos, y de estas, 25 están catalogadas como las peores malas hierbas en todo el mundo (Holm et al., 1977 y Cobb, 1992).

Estas especies de malas hierbas exóticas representan importantes amenazas económicas o medio ambientales en todo el mundo. Los métodos para evaluar el riesgo potencial de introducción de especies son los aspectos clave en el manejo de las invasiones de plantas (Hulme, 2012). Se estima que las malas hierbas introducidas pueden ser responsables de hasta un 40% de las pérdidas económicas en la agricultura (Pimentel et al., 2001).

Las malas hierbas suponen la plaga más importante para el cultivo de trigo a nivel mundial y según las estimaciones de Oerke (2006) producen pérdidas de un 23% del rendimiento potencial. En el cultivo del trigo, estas malas hierbas, se pueden clasificar en dos grandes grupos (Recasens y Conesa, 2009 y RAIF, 2014):

- **Monocotiledóneas:** Son plantas donde una sola hoja sale de la semilla, herbáceas, anuales o perennes, con tallo cilíndrico hendido con nudos. Las hojas son finas y alargadas y los tallos poseen a menudo granos harinosos en espigas. Entre ellas se pueden destacar *Avena* spp., *Lolium* spp. y *Phalaris* spp.
- **Dicotiledóneas:** Plantas de hojas anchas, cuyas primeras hojas que salen de las semillas son dos cotiledones. Son: *Amaranthus retroflexus*, *Anegallis arvensis* L., *Capsella bursapastoris*, *Centaurea* spp., *Chenopodium* spp., *Conyza Canadensis*, *Diploaxis virgate*, *Ecballium elaterium*, *Fumaria officinalis* L., *Galium aparine* L., *Malva sylvestris*, *Matricaria chamomilla*, *Molucella laevis*, *Papaver rhoeas*, *Picris* spp., *Polygonum* spp., *Psoralea bituminosa*, *Raphanus raphanistrum*, *Ridolfia segetum*, *Rumex bucephalophorus*, *Senecio vulgaris*, *Sinapis arvensis*, *Sonchus oleraceus*, *Silybum marianum*, *Torilis* spp., *Urtica dioica*, *Veronica hederifolia* y *Viola arvensis*.

1.2.2. *Lolium* spp

Una de las especies más importantes de malas hierbas anuales en cereales, el vallico (*Lolium rigidum* L.) se encuentra presente en toda el área cerealista. En muchos casos, su densidad en el cultivo puede superar a la de la avenilla (*A. fatua* L.), la principal mala hierba anual en cereales a escala mundial. Su interferencia con el cultivo de trigo aumenta con la fertilización nitrogenada. La mayoría de estos biotipos exhiben resistencia cruzada a herbicidas inhibidores de la ACCasa y a glifosato (Espinoza et al., 2009; Diez de Ulzurrun y Leaden, 2012; Metzler y Ahumada, 2016; Fernández-Moreno, 2017). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos que confieren la resistencia a uno u otro grupo de herbicidas. Por otra parte, debido a su elevada capacidad de producción de semillas, la falta de control durante un año puede significar una alta infectación para la temporada siguiente (Appleby et al., 1976). La magnitud de esta interferencia depende del momento de emergencia de la mala hierba: si es temprana, sus semillas ya han pasado a formar parte del banco de semillas del suelo al final del ciclo del cultivo, mientras que si es tardía, las plantas inmaduras dificultan la cosecha del trigo (Pedreros, 2001).

Según la ECPA (European Crop Protection Association), el género *Lolium*, se encuentra entre los cinco primeros en lo que a número de casos de resistencia a herbicidas se refiere. Es de destacar en que en 1995 ya se hablaba en Italia de resistencia a glicinas y tolerancia a imidazolinonas.

La gran facilidad que *Lolium rigidum* muestra en la generación de resistencia es consecuencia de la variabilidad genética propia de la especie, que permite la presencia de individuos con tolerancia natural dentro de las poblaciones. Al ser seleccionados mediante la aplicación de herbicidas, estos individuos ven favorecido su desarrollo y dispersión por características intrínsecas del género *Lolium*, como la alta capacidad de persistencia (tolerancia a salinidad, pH levemente ácidos, etc.) y competencia por los recursos del medio, facilitando el rebrote, la gran producción de semillas o su frecuente presencia, contaminando así las semillas de cultivo.

1.2.3. Importancia agronómica

El carácter invasivo es aspecto común en las malas hierbas y se debe a una competencia ventajosa frente a los cultivos comerciales, ventaja que, según Menéndez (1997) obtienen principalmente por:

- Elevada producción de semillas.
- Semillas de tamaño similar a las del cultivo.
- Más de un modo de propagación o dispersión de semillas.
- Tiempo de maduración de semillas corto.
- Dispersión efectiva de semillas.
- Sabor desagradable.
- Aspecto poco llamativo.
- Buena supervivencia en condiciones adversas.
- Crecimiento retardado de órganos vegetativos.
- Germinación escalonada de semillas.

Como se ha citado anteriormente, las malas hierbas causan considerables pérdidas de producción en todo el mundo, tal y como se refleja en la tabla 3.

Tabla 3. Producción real y pérdidas (billones de dólares) estimadas en 8 cultivos, por plagas y región (Haigh, 2000).

Región	Producción real	Causas de las pérdidas			TOTAL
		Patógenos	Insectos	Malas hierbas	
África	13.3	4.1	4.4	4.3	12.8
Norte América	50.5	7.1	7.5	8.4	22.9
Latino América	30.7	7.1	7.6	7.0	21.7
Asia	162.9	43.8	57.6	43.8	145.2
Europa	42.6	5.8	6.1	4.9	16.8
Oceanía	3.3	0.8	0.6	0.5	1.9

Aunque las pérdidas son significativas en países con sistemas de producción agrícola muy desarrollados como los encontrados en Europa, Norte de América y Australia, las pérdidas se incrementan en los países menos desarrollados (Haigh, 2000). Estas pérdidas se deben a varias causas (Wyse, 1978; García y Fernández-Quintanilla, 1991), entre las que se pueden destacar:

- a) *Reducción de los rendimientos*: Genéricamente, la disminución del rendimiento debida a la presencia de malas hierbas en un cultivo dependerá de factores tales como la propia especie de mala hierba, la densidad de la población y el cultivo.

- b) Interferencia en la recolección: La presencia de malas hierbas retrasa y dificulta la recolección. Las dificultades se derivan de los atascos originados en la maquinaria debido a la presencia de materia vegetal verde y húmeda (la maduración de las malas hierbas es posterior a la del cultivo). Estos atascos provocan paradas para la limpieza de la maquinaria y suponen un mayor desgaste de los equipos y un aumento en el número de averías.
- c) Incremento de los costes de producción: Este incremento se debe principalmente a los gastos originados por el control de las malas hierbas, ya sea un control mecánico (incremento del número de labores, maquinaria, carburante, etc.) o químico (herbicidas). Los costes indirectos también se ven afectados, tanto con el tiempo de cultivo (empleo de cultivos poco rentables en la rotación, retrasos en la fecha de siembra, etc.) como en la cosecha.
- d) Disminución de la calidad de los productos: La menor calidad puede expresarse como:
- Transferencia al producto de sabores y olores desagradables procedentes de las semillas de malas hierbas o restos de éstas que confieren, además, una mayor humedad a la cosecha.
 - Presencia en el producto de sustancias tóxicas, como es el caso de las infestaciones de *Solanum nigrum* (tomatito) en el cultivo de guisante o en brásicas silvestres que, debido a la similitud del tamaño de las semillas de mala hierba y de cultivo hace su separación prácticamente imposible.
 - Pérdida de la calificación de semilla certificada debido a niveles superiores a los permitidos se semillas de la población infectante.
- e) Reducción en el valor de la tierra: Esta evaluación, debida a la presencia en un gran banco de semillas, puede ser de hasta un 50% (Menéndez, 1997).
- f) Hospedaje de plagas y enfermedades: Determinadas especies de malas hierbas son huéspedes de insectos y microorganismos potencialmente dañinos, pudiendo inocular-transferir tales agentes al cultivo que infectan. En este sentido, el objetivo de la agricultura ha sido siempre producir los mayores rendimientos reduciendo la presencia de plantas indeseadas mediante la utilización de distintas técnicas.

1.2.4. Métodos de control

Las características comunes en malas hierbas y plantas cultivadas hacen que ambas requieran de los mismos recursos vitales disponibles en su entorno (agua, luz, nutrientes, oxígeno, CO₂, espacio, etc.). Esto puede originar una posible interferencia de las malas hierbas con el cultivo si estos recursos no están disponibles en cantidad y calidad suficientes para el crecimiento y desarrollo de ambas especies (García y Fernández, 1991).

Al tratar de minimizar los daños tanto directos como indirectos de las malas hierbas, reflejados principalmente en pérdidas económicas, se establecen diferentes métodos de control. Dichos métodos se pueden utilizar de forma individual o realizando una combinación de varios de ellos en función del objetivo perseguido y las condiciones atmosféricas y del cultivo (MAGRAMA, 2006).

Los principales métodos utilizados para el control de malas hierbas son los siguientes:

1. Métodos preventivos: Son todos aquellos que evitan la introducción, establecimiento y desarrollo de especies de malas hierbas en áreas no infectadas. Estas medidas pueden ser el uso de una semilla certificada libre de semillas o propágulos de las malas hierbas, la eliminación de malas hierbas de balsas, canales de riego y caminos, la limpieza de aperos y maquinaria agrícola usada en áreas infectadas y evitar el acceso del ganado de zonas de alta infestación a zonas libres. Otra medida de prevención es la restricción de material vegetal entre provincias y países por medio del establecimiento de cuarentenas.
2. Métodos culturales: Todas aquellas prácticas agrícolas que promueven un mejor desarrollo de la especie cultivada para hacerla más competitiva respecto a la mala hierba. Estas prácticas son principalmente:
 - a) Rotación de cultivos: Consiste en alternar diferentes cultivos en la misma área cada año. Ciertas especies de malas hierbas están asociadas con cultivos específicos. Además, las poblaciones de estas malas hierbas aumentan cuando se utiliza el mismo cultivo en la misma tierra durante varios años. Esto se debe a que las mismas condiciones ambientales o de cultivo que favorecen al cultivo están favoreciendo igualmente a las malas hierbas. Por esta razón, la rotación de cultivos ayuda a controlar las malas hierbas. Además se producen otros beneficios como el incremento del

rendimiento, la reducción de enfermedades o la mayor fijación de N atmosférico.

- b) Cubiertas vegetales: Se desarrollan dos cultivos simultáneamente, aunque uno de ellos es más importante desde el punto de vista económico. Con esto se minimiza la presencia de suelo descubierto, reduciendo la germinación de semillas de malas hierbas.
 - c) Recolección: Aunque no se considera un método de control en sí, la recolección puede promover cierto nivel de supresión de malas hierbas. Por ejemplo, es común recolectar alfalfa varias veces durante el periodo de crecimiento. El ritmo de las operaciones de recolección puede afectar a la disponibilidad de agua, así como cambiar ciertas condiciones necesarias para la germinación de la mala hierba.
3. Métodos físicos: Existen diversos métodos mecánicos para la eliminación de malas hierbas, entre los que se engloban todos los que desarraigan, entierran, cortan, cubren, o queman la vegetación. Consistente, entre otros, en labrar, retirar manualmente, quemar, segar o inundar.
4. Métodos biológicos: Utilizan enemigos naturales para eliminar especies de malas hierbas, entre los que se pueden destacar:
- a) Pastoreo: Es un método tradicional y comúnmente usado para el control biológico de malas hierbas. Se pueden usar una gran variedad de animales que se alimenten de esas plantas: rumiantes, aves, insectos, peces, etc.
 - b) Micoherbicidas: El uso de patógenos de plantas ha sido ampliamente usado para el control de malas hierbas y tiene la ventaja de que estos organismos se obtienen en medios artificiales de una forma barata y fácil. Además, estos patógenos pueden aplicarse en el campo de la misma forma que los herbicidas. Si el organismo es un hongo se le da el nombre de micoherbicida. El mayor inconveniente es su especificidad y su sensibilidad al ambiente.
 - c) Alelopatía: Es cualquier efecto dañino producido, de forma directa o indirecta, por una planta sobre otra a través de la producción de sustancias químicas que entran en el medio ambiente, impidiendo la germinación, emergencia o desarrollo de una mala hierba.

5. *Métodos químicos*: Suponen el uso de herbicidas, que aplicados en época y dosis adecuadas inhiben el desarrollo o matan a las plantas indeseadas. Aunque existen inconvenientes en su uso, presentan un gran número de ventajas que hacen que sean el método más empleado y eficaz, algunas de ellas son:
- a) Control temprano de la mala hierba, al eliminar antes de la emergencia o bien en las primeras etapas de desarrollo.
 - b) Amplio espectro de acción, pudiendo controlar varias especies con una sola aplicación.
 - c) Control de malas hierbas perennes con reproducción asexual (bulbos, rizomas, etc.).
 - d) Control residual de malas hierbas al aplicar un herbicida de gran persistencia en el suelo.

De su estudio se encarga la Malherbología, disciplina científica que ha conseguido grandes avances en el desarrollo de herramientas y tácticas para el control de malas hierbas. Los principales aspectos a los que se dirige esta ciencia son los siguientes (Hess, 1994; Sanyal et al., 2008):

- Incrementar el conocimiento del impacto económico y ecológico de las malas hierbas en diferentes cultivos.
- Mejorar el conocimiento de la biología, ecología y genética de las malas hierbas para optimizar su manejo.
- Optimizar el uso en el campo de agentes biológicos y de productos naturales.
- Estudiar poblaciones de malas hierbas resistentes a herbicidas para mejorar su control.
- Desarrollar nuevas tecnologías para la aplicación de herbicidas con el fin de mejorar su actuación y minimizar su efecto en el medio ambiente.
- Desarrollar mejores métodos para detectar residuos de herbicidas en agua, suelo y vegetación.

El control de malas hierbas en trigo, desde la aparición a mediados de los años 40 del 2,4-D, ha ido mejorando gracias a la disponibilidad de una gran variedad de materias activas selectivas pertenecientes a diversas familias químicas. Dichas materias se formulan solas o mezcladas y a una o varias concentraciones, existiendo multitud de productos comerciales que, a su vez, se utilizan en función

de su capacidad para controlar, de forma más o menos específica, a las distintas especies de malas hierbas.

Otra modalidad de control de malas hierbas en los cultivos consiste en el empleo de herbicidas no selectivos (totales o de amplio espectro) para lo que se requiere el disponer de variedades de trigo resistentes a dichas materias activas.

Asimismo, se han desarrollado variedades de algunos cultivos resistentes a imidazolinonas, que son herbicidas de amplio espectro de control de malas hierbas. Dichas variedades son conocidas como “variedades IMI” y su uso conlleva de forma inherente la tecnología Clearfield®.

1.3. Herbicidas

1.3.1. Generalidades

Las malas hierbas, y en consecuencia la planificación de estrategias de control, están ligadas a la actividad agrícola desde sus comienzos. Antiguamente, estas técnicas implicaban la retirada manual y el uso de instrumentos de labranza primitivos (6000 a. C.), o sirviéndose de la ayuda de animales (1000 a. C.), hasta la aparición de los primeros utensilios mecánicos ya sobre los años 20 de nuestra era, también existía un control biológico (1930) y un control químico, iniciado con la aparición de los dos primeros herbicidas selectivos, MCPA y 2,4-D (1947) (Heap, 2011).

Desde su implantación en los sistemas de cultivo moderno, los herbicidas han ido aumentando su importancia hasta convertirse en la principal herramienta de lucha contra malas hierbas de las agriculturas desarrolladas. Este hecho puede deberse a distintas razones (Coble, 1996; Menéndez, 1997; Bastida y Menéndez, 2001):

- a) Son productos altamente fiables y eficaces: Con frecuencia los herbicidas ofrecen un control prácticamente completo de las especies tratadas, a la vez que resultan casi inocuos en los cultivos que protegen. Esta eficacia suele estar muy por encima de la presentada por otras opciones de control en la mayoría de los cultivos.
- b) Son de fácil manejo: La mayoría de los herbicidas no requieren una maquinaria especial o prácticas culturales complejas antes o después del tratamiento.

- c) Son económicamente rentables: El coste de los herbicidas por unidad de superficie es menor que el de cualquier otro método. Esta comparación es aún más favorable cuando se incluye el tiempo requerido para aplicar otras medidas de control.
- d) Son agrónomicamente versátiles: Los herbicidas ofrecen al agricultor la posibilidad de elegir cuándo y cómo controlar el problema de malas hierbas, permitiendo un margen de uso que va desde la preemergencia a la postemergencia tardía.

En contraposición a lo anterior, en la actualidad existe una gran controversia sobre los efectos perjudiciales que producen los plaguicidas químicos en la salud humana y el Medio Ambiente. Por lo que se plantean una serie de alternativas que reemplacen el uso de estos plaguicidas, como son:

- *Uso de cultivares resistentes a plagas:* Se produce un importante aumento en el uso de cultivos modificados genéticamente, existiendo un número elevado de cultivos transgénicos resistentes a herbicidas (Berner et al., 1997).
- *Control biológico de plagas:* Los bioplaguicidas son un tipo de plaguicidas que derivan de materiales naturales como los animales, plantas, bacterias o minerales. Un ejemplo es la nicotina, que se utiliza como insecticida natural en determinados cultivos. Aunque en los últimos años se ha retirado ya que se ha comprobado que afecta a las abejas, principales polinizadores.
- *Mejora en la formulación y en los métodos de aplicación de los productos:* Las instituciones que dominan el mercado de los plaguicidas están investigando sobre el desarrollo de productos nuevos, que sean menos tóxicos, menos persistentes en el medio y con un espectro de acción menos amplio para cumplir los requisitos exigidos en los mercados de todo el mundo.
- *Uso de sistemas expertos de decisión en el control de plagas:* El MIP (Manejo Integrado contra Plagas) puede ser otra alternativa para reducir el uso de plaguicidas químicos. Se puede definir como un concepto que incluye la combinación de diversas medidas de control directas (medidas mecánicas, químicas o biológicas) e indirectas (métodos culturales, siembra y fertilización) para mantener las poblaciones de malas hierbas bajo un umbral económicamente admisible (Zwerger, 1996).

1.3.2. Clasificación y modo de acción

El Comité de Acción Contra la Resistencia a Herbicidas (HRAC) utiliza el modo de acción de los herbicidas en las plantas como criterio principal de clasificación. Esta clasificación es la que proporciona más información sobre la interacción última entre herbicida y planta (Duke y Dayan, 2001; Schmidt, 2005) y, consecuentemente, expresa el efecto fitotóxico del herbicida. De acuerdo a este Comité se dividen 25 grupos químicos (Tabla 4). Es una importante herramienta en el momento de la toma de decisión en la elección de las moléculas herbicidas para el control de las malas hierbas.

La clasificación de los herbicidas según su modo de acción permite predecir, en forma general, su espectro de control sobre las malas hierbas, época de aplicación, selectividad a cultivos y su persistencia en el suelo (Ashton y Craft, 1981).

Una de las características más importantes de los herbicidas es su modo de acción, en el cual interactúan procesos fisiológicos y bioquímicos, y que además, de acuerdo a Devine et al., (1993) implica todo un proceso de etapas relacionadas con la entrada, movimiento y llegada del herbicida hasta el sitio donde ejercerá el efecto fitotóxico en la planta.

La mayoría de los herbicidas resultan letales para las plantas debido a su efecto sobre un sitio primario de especial relevancia biológica. Esta actuación suele conducir a una serie de efectos secundarios y terciarios que acaban produciendo la muerte de la planta. La acción del herbicida se puede estudiar en dos fases: la primera fase que conlleva el movimiento del herbicida al sitio de acción (bien por vía foliar o bien por vía radicular), mientras que la segunda fase conlleva las consecuencias metabólicas resultantes de la interacción en el sitio de acción (Devine et al. 1993).

Tabla 4. Clasificación de los herbicidas según su modo de acción (HRAC, 2008).

Grupo	Modo de acción	Familia química
A	Inhibición de la acetil CoA carboxilasa (ACCase)	Ariloxifenoxipropionatos, ciclohexanodionas, fenilpirazolinonas
B	Inhibición de la acetolactato sintasa (ALS)	Imidazolinonas, sulfonilureas, triazolopirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos, sulfonilaminocarboniltriiazolinonas
C1	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Triazinas, triazinonas, uracilos, piridazinona, fenil-carbonatos
C2	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Ureas, amida
C3	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Nitrilos, benzotiadiazol, fenil-piridazina
D	Desviación del flujo electrónico en el fotosistema I	Bipiridilos
E	Inhibición del protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Difeniléteres, N-fenil-ftalamidas, tiadiazoles, oxadiazol, triazolinona
F1	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)	Piridazinona, nicotinanilida, otros
F2	Decoloración: inhibición de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (4-HPPD)	Trikenona, ixosazol, pirazol
F3	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides (punto desconocido)	Triazol, isoxazolidinona, urea
G	Inhibición de la EPSP sintetasa	Glicinas
H	Inhibición de la glutamino sintetasa	Ácido fosfínico
I	Inhibición del DHP (dihidropterato) sintetasa	Carbamato
K1	Inhibición de la unión de los microtúbulos de la mitosis	Dinitroalinas, fosforoamidatos, piridazina, ácido benzoico
K2	Inhibición de la mitosis	Carbamatos, benzileter
K3	Inhibición de la división celular	Cloroacetamidas, carbamato, acetamida, benzamida, oxiacetamida
L	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	Nitrilos, benzamida
M	Desacopladores (alteración de la membrana)	Dinitrofenoles
N	Inhibición de la síntesis de los lípidos (no ACCase)	Tiocarbamatos, fosforoditioato, benzofurano, ácidos clorocarbónicos
O	Auxinas sintéticas (como la acción del ácido indolacético, AIA)	Ácidos fenoxi-carboxílicos, ácido benzoico, ácido piridin-carboxílico, ácido quinolin-carboxílico, otros
P	Inhibición del AIA	Ftalamato, diflufenzopir
R/S/T/Z	Desconocido	Ácido arilamino propiónico, organoarsenicales, otros

1.3.3. Herbicidas Imidazolinonas

Las imidazolinonas fueron desarrolladas en la década de los 80 por la American Cyanamid Company en Princeton, New Jersey (EEUU), actualmente BASF Corporation. Estas no fueron desarrolladas con el objetivo de inhibir la enzima ALS, aunque estudios

posteriores demostraron, gracias a la introducción del ingrediente activo imazaquin (Scepter®), que estos herbicidas actuaban inhibiendo dicha enzima (Shaner et al., 1984).

Desde su aparición, han tenido un gran éxito en la agricultura moderna, no sólo por su alta eficacia en ciertos cultivos de cereales (Clearfield®) y en leguminosas, sino también por su baja toxicidad en mamíferos y su bajo impacto ambiental (Aichele y Penner, 2005; FAO, 2012). En 1998 apareció una nueva imidazolinona bajo el nombre de imazamox (Ácido (RS)-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5- metoximetilnicotínico) (Brady et al., 1998; Comisión Europea, 2002).

Todas las imidazolinonas presentan en su estructura molecular un anillo imidazol con un grupo metilo, y una segunda estructura cíclica, generalmente un anillo aromático carboxilado, que puede variar (Duggleby et al., 2008). En el caso del imazetapir, imazapir, imazapic e imazamox se trata de un anillo pirimidínico, distinguiéndose entre ellas únicamente por el sustituyente del carbono 5 de ese anillo, en el caso del imazamox ese anillo va enlazado a un grupo metoximetil que lo distingue de los anteriores (Krieguer, 2001). El anillo imidazol y la segunda estructura cíclica juegan un papel importante en la inhibición de la ALS, mientras que los diferentes grupos funcionales del anillo pirimidínico se relacionan con otras características del herbicida como su metabolismo en plantas (Tan et al., 2005).

Su efectividad en campo es debida a una combinación de varios factores, entre los que se encuentran su fácil translocación, bajo metabolismo y persistencia en el suelo. En el caso concreto del imazamox, este es fácilmente absorbido por las hojas y también por las raíces (Lorente, 2003; Jiménez, 2016).

Son herbicidas que controlan un amplio espectro de malas hierbas y se usan de forma generalizada en cultivos de cereales, leguminosas y en plantaciones forestales. Como hemos visto, su modo de acción primario es la inhibición de la enzima acetolactato sintasa (Powles y Yu, 2010).

1.3.4. Inhibición de la enzima acetolactato sintasa (ALS)

La acetolactato sintasa (ALS) ó acetohidroxiácido sintasa (AHAS) es una enzima situada en los cloroplastos, está compuesta por dos subunidades, una mayor que es la catalítica y otra menor que es regulatoria. El sitio activo de la enzima se localiza en la interfase entre

las dos subunidades, cercano al sitio propuesto de unión de los herbicidas (Pang et al., 2002).

Su función primordial es catalizar el primer paso común en la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada: valina, leucina e isoleucina (Figura 4), que son aminoácidos esenciales imprescindibles para el desarrollo de plantas y microorganismos (Saari y Mauvais, 1996; Powles y Yu, 2010). Actúa deteniendo el crecimiento y produciendo posteriormente la muerte en plantas susceptibles poco tiempo después de la aplicación (4-6 semanas después de la aplicación).

Junto a este mecanismo primario, se producen unos efectos secundarios de producción de 2-cetobutirato, alteración del transporte de fotosintatos y disminución en la síntesis de proteínas interviniendo en el mecanismo general causante de la muerte de las plantas sensibles a inhibidores de la ALS (Tranel y Wright, 2002).

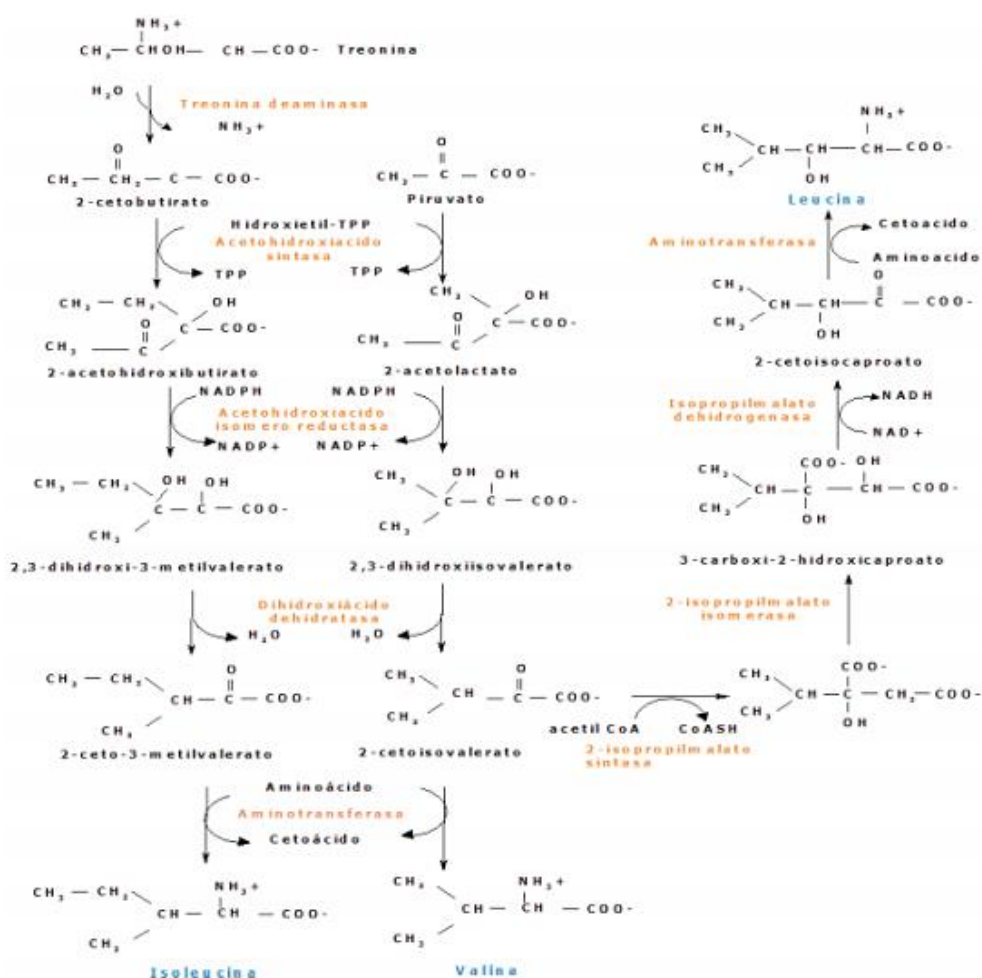


Figura 4. Ruta biosintética de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Coruzzi y Last, 2000).

Esta enzima condensa dos moléculas de piruvato para formar CO_2 y 2-acetolactato, que es el precursor de valina y leucina. La ALS también puede desarrollar la misma reacción con piruvato y 2-cetobutirato para formar CO_2 y 2-acetohidroxibutirato, un precursor de isoleucina. La ALS requiere FAD, tiaminapirofosfato (TPP) y Mg para su actividad, y la enzima produce hidroxietil-TPP (HETPP) como producto intermedio.

El gen de la acetolactato sintasa tiene un tamaño aproximado de 2,1 Kb y codifica una proteína que contiene entre 650-700 aminoácidos. Las mutaciones que confieren resistencia tienen lugar fundamentalmente en 5 dominios conservados (llamados A, B, C, D y E) (Devine y Eberlein, 1997). Estos dominios están agrupados en dos zonas en la molécula: una comprende los aminoácidos 124 a 205 (usando la secuencia *Arabidopsis* como patrón para la numeración de aminoácidos) y otra que va de los aminoácidos 574 a 653.

Las mutaciones que no afectan la actividad catalítica de ALS pero que reduce la sensibilidad a los herbicidas, se producen en cinco posiciones de amino ácido altamente conservadas, conocidas como Ala122, Pro197, Ala205, Trp574 y Ser653 (Tranel y Wright, 2002; Jander et al., 2003; Patzoldt et al., 2001; Kolkman et al., 2004). Las mutaciones en Ala122 y Ser653 en la subunidad catalítica de ALS confieren una fuerte resistencia a imidazolinonas pero no a sulfonilureas (Bernasconi et al., 1995; Hattori et al., 1992). Pro197 es el aminoácido que más frecuentemente presenta sustituciones en el sitio de unión con el herbicida en la enzima ALS, dando alto nivel de resistencia a herbicidas sulfonilureas (Tranel y Wright, 2002; Powles y Yu, 2010; Yu y Powles, 2014).

Los herbicidas que actúan en la enzima acetolactato sintasa (ALS) inhibiéndola, comprenden cinco familias químicas (Figura 5). Dichas familias son las imidazolinonas (IMI), sulfonilureas (SU), triazolopirimidinas (TP), pirimiditiobenzoatos (PTB) y sulfonil amino carbonil triazolinonas (SCT), todos ellos muy utilizados en el mundo debido a su amplio espectro de control de malas hierbas (Mallory-Smith y Retzinger Jr., 2003; Arregui y Puricelli, 2008). Aunque alguno de ellos con limitaciones reglamentarias en algunos países.

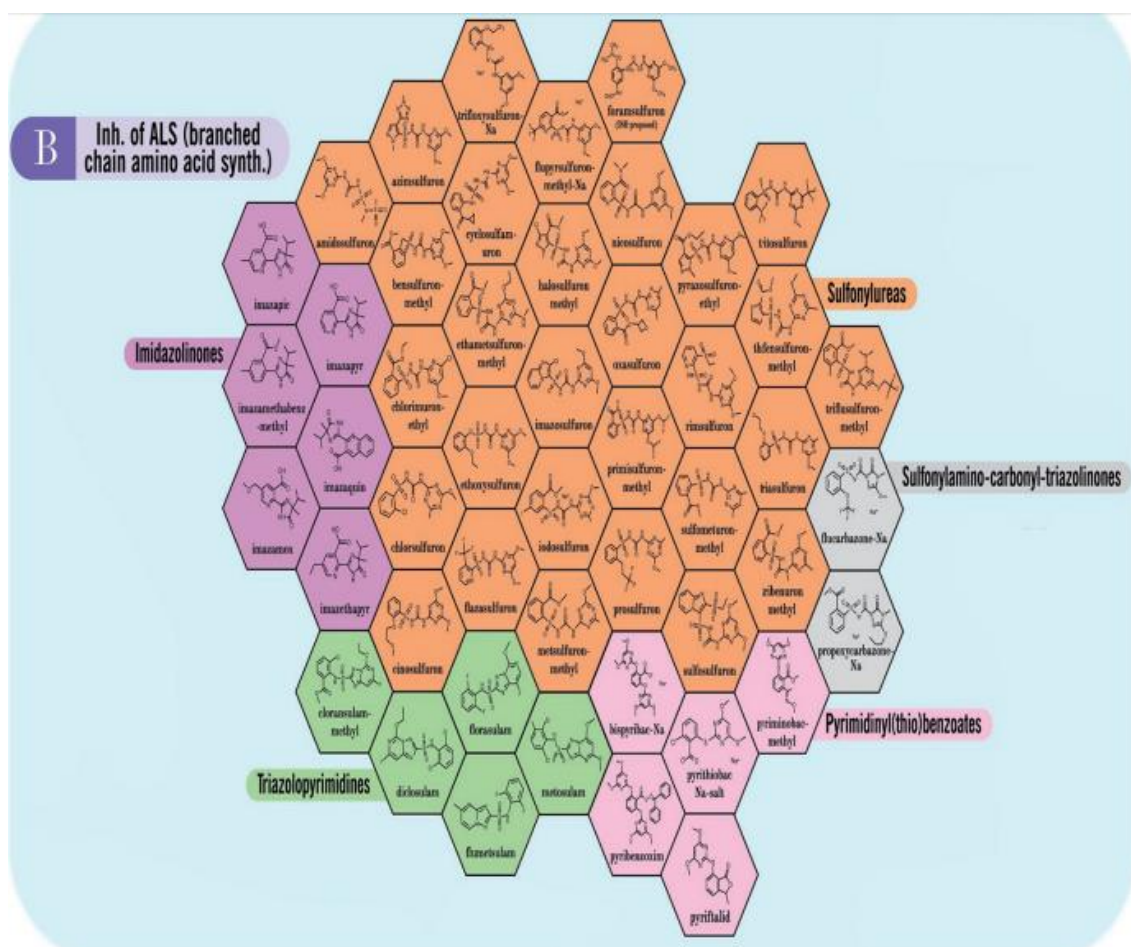


Figura 5. Herbicidas inhibidores de acetolactato sintasa (ALS) (Heap, 2002).

1.3.5. Glufosinato

El glufosinato es un herbicida que se descubrió en el año 1972 en unos laboratorios de Alemania cuando se estaba aislando un aminoácido de una especie de bacteria del suelo llamada *Streptomyces viridochromogenes* (Bayer et al., 1972), demostrándose en poco tiempo que este aminoácido presentaba actividad herbicida. El glufosinato pertenece a la familia química de los derivados de los ácidos fosfónicos. Este herbicida inhibe la actividad de la enzima glutamina sintetasa (GS) (Figura 6), es no selectivo y de origen natural. No es absorbido por tallos lignificados, lo que permite su uso en frutales y en vides (cultivos leñosos). La estructura del glufosinato es el tripéptido fosfotricina (PPT) unido a dos moléculas de alanina. El glufosinato amonio es una mezcla de D y L fosfotricina. Su nombre químico es 2-amino-4-(hidroximetilfosfinil) butanoato amónico.

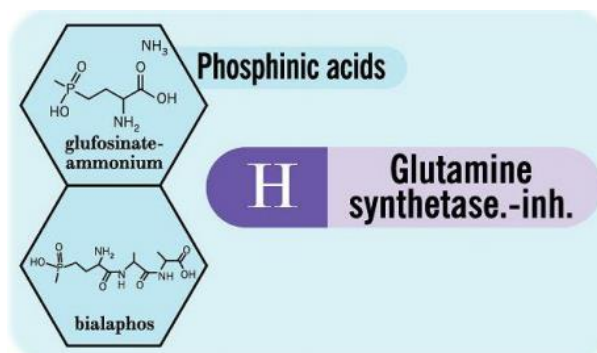


Figura 6. Herbicidas inhibidores de la GS. Glufosinato y bialafos.

1.3.6. Actividad GS en plantas

La glutamina sintetasa cataliza la síntesis de L-glutamina a partir de L-glutamato ATP y NH_3 (Figura 7). La GS utiliza el NH_3 producido por la reducción del nitrato, la degradación de aminoácidos y la fosforilación, y cataliza la condensación dependiente de ATP del glutamato que carga un amonio dando glutamina. La hidrólisis del ATP direcciona el primer paso de un mecanismo consistente en dos etapas. El ATP fosforila el glutamato para formar ADP y el intermediario acetil fosfato para dar un γ glutamil fosfato que reaccionará con el ión amonio, formando glutamina y un fosfato inorgánico.

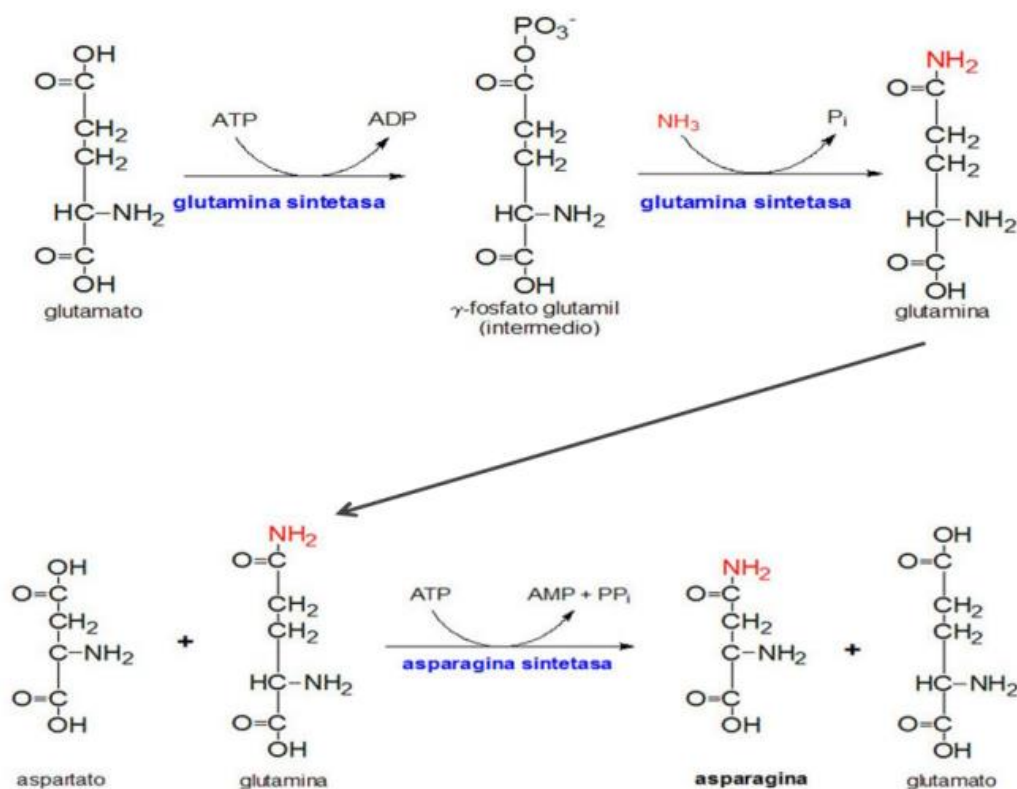


Figura 7. Reacción de catálisis de la GS y su efecto en la biosíntesis de la asparragina.

1.4. Mecanismos de resistencia de las plantas a herbicidas

1.4.1. Definición resistencia-tolerancia

Existe un gran número de herbicidas que resultan eficaces frente a cualquier tipo de planta, los más importantes son los herbicidas capaces de controlar un amplio espectro de malas hierbas sin afectar a los cultivos en los que se aplican. Esta acción selectiva hace que determinadas especies de cultivos, y también de malas hierbas, sean capaces de sobrevivir y desarrollarse a las dosis recomendadas de aplicación agrícola del herbicida. Este tipo de respuesta se conoce como tolerancia natural y ha sido definida por el HRAC como la “habilidad/aptitud heredable de una especie vegetal a sobrevivir y reproducirse después de un tratamiento, pudiendo considerarse como una característica a nivel de especie”. El término tolerancia se usa no sólo para referirse a variaciones entre especies sino también en relación con la variabilidad dentro de una misma especie (Lebaron y Gressel, 1982).

Gracias a la presión selectiva impuesta por la aplicación continuada de herbicidas, es posible el desarrollo de biotipos que dejan de ser sensibles a un determinado producto al que originalmente eran susceptibles. A este fenómeno se denomina resistencia, siendo una característica adquirida por un biotipo de una especie que carecía de ella (HRAC).

Asimismo, la resistencia es un proceso evolutivo en el que una población cambia de ser sensible a ser resistente, es decir, la proporción de individuos originalmente resistentes dentro de la población se incrementa a lo largo del tiempo.

El término resistencia se puede asociar a mecanismos de resistencia que posee un individuo (Jutsum y Graham, 1995), o a familias de herbicidas a los que es resistente (Rubin, 1991). Surgiendo así los conceptos de resistencia cruzada y resistencia múltiple.

El término resistencia cruzada se usa para describir una población de malezas que es resistente a dos o más herbicidas (de la misma familia química) debido a la presencia de un mecanismo de resistencia único. También se puede hablar de resistencia cruzada negativa, dándose en aquellos casos en los que un biotipo resistente a un herbicida exhibe un aumento en la sensibilidad a otros herbicidas con distinto modo de acción o de degradación (De Prado et al., 1992).

El concepto de resistencia múltiple se refiere a aquellas plantas resistentes a dos o más grupos diferentes de herbicidas con dos o más mecanismos de resistencia. Esta resistencia

es más compleja y de difícil solución, ya que se atribuye a diferentes mecanismos que operan a nivel de absorción, retención, translocación y metabolismo (Retzinger y Mallory-Smith, 1997).

Por último, tolerancia y resistencia son expresiones usadas para diferenciar la intensidad de un mismo fenómeno, siendo la resistencia un caso extremo y menos frecuente de tolerancia (Holt y LeBaron, 1990).

1.4.2. Mecanismos de resistencia

El grado de resistencia depende de la relación entre individuos resistentes y sensibles en una misma población (Moss, 2002). Es importante tener en cuenta que la proporción de genes resistentes en toda la población puede haberse incrementado durante años antes de que se advierta un problema de control en campo.

La aplicación anual de plaguicidas es de millones de toneladas por año. Sin embargo, se ha estimado que sólo un pequeño porcentaje de estos productos alcanzan el organismo objetivo, el resto se deposita en el suelo y en organismos no objetivo y se mueve hacia la atmósfera y el agua (Rodríguez-Castellanos y Sánchez-Hernández, 2007).

Existen al menos cinco mecanismos generales de resistencia, asociados a procesos fisiológicos y estructurales en las plantas, que pueden explicar la resistencia a herbicidas (Sherman et al., 1996). Estos son:

- a) Pérdida de afinidad por el sitio de acción: Los herbicidas resultan letales para las plantas debido a su actividad sobre el sitio de acción primario, éste suele ser específico y la acción del herbicida sobre él suele conducir al desarrollo de efectos secundarios, que normalmente producen la muerte de la planta (Cobett et al., 1994). Una o varias mutaciones en la secuencia aminoacídica del sitio primario de acción pueden resultar en una pérdida de afinidad del herbicida por ese sitio, imposibilitando la unión efectiva de ambos e impidiendo así la continuidad del proceso vital mediado por dicho sitio (Devine y Shimabukuro, 1994; Grownwald, 1994; Saari et al., 1994). Este tipo de mecanismo es el que exhiben la mayoría de los biotipos resistentes descritos hasta el momento. Se caracteriza por conferir un alto grado de resistencia al herbicida empleado e incluso a otras moléculas pertenecientes a la misma familia química.
- b) Secuestración o compartimentación: Son mecanismos de resistencia o tolerancia poco conocidos debido a que los indicios en los que se apoyan son circunstanciales en su

- mayoría (Coupland, 1991; Owen y Pallutt, 1991; Ge et al., 2010). Los pocos casos encontrados en bibliografía justifican la resistencia, tanto en líneas de cultivos celulares como en plantas enteras, como un incremento en la capacidad de secuestrar el herbicida o los metabolitos potencialmente fitotóxicos en la vacuola celular. Los procesos subyacentes a estos mecanismos de secuestación son todavía desconocidos.
- c) Reparación de efectos fitotóxicos: Algunos herbicidas ariloxifenoxipropanoatos inhibidores de la enzima acetil coenzima A carboxilasa, despolarizan en potencial de la membrana plasmática en células parenquimáticas de *Avena sativa*, *Triticum aestivum*, *Lolium rigidum*, etc. La capacidad despolarizadora de algunos de estos herbicidas como diclofop-metil se debe al flujo específico de protones que este compuesto produce hacia el interior de la célula (Shimabukuro y Hoffer, 1997). Aunque también se han identificado biotipos de malas hierbas cuyo mecanismo de resistencia al diclofop-metil parece ser debido a la capacidad de recobrar el potencial de membrana una vez que se ha retirado el herbicida causante de la despolarización (De Prado et al., 1999).
- d) Reducción de la concentración de herbicida en el sitio de acción: Una condición necesaria para lograr efectividad de un herbicida es que una concentración suficiente alcance su sitio de acción para que el efecto sea letal. La falta de movimiento de un herbicida reduce la concentración de éste en el sitio de acción, lo que le permite mantenerse funcional. Las bajas concentraciones pueden deberse a la reducción en la penetración, absorción, translocación o a la existencia de fenómenos de secuestación en orgánulos celulares. la falta de absorción, penetración o translocación de herbicidas es básicamente un mecanismo de tolerancia existente en numerosos cultivos y en algunas malas hierbas (Hess, 1985; De Prado et al., 2001; Michitte et al., 2004; Ruíz-Santaella et al., 2004; Cruz-Hipolito et al., 2009).
- e) Metabolización a especies no tóxicas: Los procesos de detoxificación metabólica se caracterizan por ser procesos biológicos con los que las moléculas tóxicas son metabolizadas a compuestos inocuos o menos tóxicos. En los procesos de detoxificación metabólica los biotipos resistentes son capaces de degradar el herbicida antes de que éste cause daños irreversibles (De Prado, 2012; Villalba, 2009). La velocidad de degradación enzimática puede variar debido a factores endógenos y exógenos como el estadio de crecimiento de la planta o las condiciones climáticas. Los procesos de detoxificación metabólica de herbicidas en tejidos vegetales pueden dividirse en tres fases (Tabla 5) (Shimakuburo, 1985; Hatzios, 1991).

Tabla 5. Tres fases del metabolismo de plaguicidas (Shimakuburo, 1985; De Prado et al., 2004).

Características	Propiedades iniciales	Fase I	Fase II	Fase III
Reacciones	Compuesto inicial	Oxidación, hidrólisis, reducción	Conjugación	Conjugación secundaria o incorporación a biopolímeros
Solubilidad	Lipofílico	Ambifílico	Hidrofílico	Hidrofílico o insoluble
Fototoxicidad	Tóxico	Modificada o menos tóxico	Muy reducida o no tóxico	No tóxico
Movilidad	Selectiva	Modificada o reducida	Limitada o inmóvil	Inmóvil

Fase I (conversión). Algunos herbicidas pueden ser conjugados directamente, sin embargo, otros no poseen sustituyentes disponibles en sus moléculas (grupos amino, hidroxilo, sufhidrilo, etc.) que puedan reaccionar para formar conjugados con constituyentes celulares. Estos herbicidas deberán ser convertidos en compuestos más solubles en agua y menos tóxicos mediante algunas de las siguientes reacciones:

-Hidrólisis: Estas reacciones están catalizadas por enzimas hidrolíticas (esterasas, fosfatasas o amidasas, dependiendo del sustrato). En las transformaciones hidrolíticas se rompen los enlaces de un sustrato por adición a cada producto de H u OH proveniente del H₂O. Hay muchas enzimas hidrolíticas capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos, particularmente aquellos que contienen grupos funcionales amida, carbamato o éster. Estas enzimas pueden estar compartimentalizadas o ser extracelulares, y las reacciones pueden ocurrir tanto en condiciones aerobias como anaerobias. La hidrólisis de enlaces éster de herbicidas en plantas y microorganismos ha sido ampliamente estudiada y analizada (Inclendon y Hall, 1997; Hoagland y Zablotowicz, 1998). La hidrólisis del enlace éster se realiza principalmente por esterasas y, en menor medida, por lipasas y proteasas. Con respecto a la hidrólisis de enlaces amida, el propanil es el herbicida más estudiado.

-Oxidaciones, oxigenaciones e hidroxilaciones: Todas ellas se pueden incluir en un grupo denominado transformaciones oxidativas. La oxigenación es el primer paso más frecuente en la biotransformación de herbicidas, siendo las hidroxilaciones las más frecuentes

observadas en plantas. La destoxificación por hidroxilación y la posterior formación de un conjugado glicósido son especialmente importantes como mecanismos de selectividad y resistencia a herbicidas en monocotiledóneas. Muchas de estas reacciones están mediadas por enzimas oxidativas (p.e. citocromo P₄₅₀) que son las enzimas más importantes en la primera fase del metabolismo de un herbicida (Barret, 2000). Los herbicidas pueden influir en los sistemas citocromo P₄₅₀ actuando como efectores, modificando o regulando así el metabolismo de los herbicidas en una planta. Además de las enzimas citocromo P₄₅₀, actuando como efectores, modificando o regulando así el metabolismo de los herbicidas en una planta. Además de las enzimas citocromo P₄₅₀, las plantas producen otras enzimas oxidativas que catalizan la polimerización de varias anilinas y fenoles (Dec y Bollag, 2001). Las peroxidasas que median el metabolismo de herbicidas que funcionan de manera similar a las P₄₅₀ intervienen en descarboxilaciones, oxidaciones sulfúricas, N-desmetilaciones, hidroxilaciones del anillo y oxidaciones aromáticas del grupo metilo (Lamoureux y Frear, 1979). En plantas, a menudo las enzimas peroxidasas funcionan en la tercera fase del metabolismo (p.e. formación de residuos ligados)

Fase II (conjugación). Los conjugados suelen ser los metabolitos finales en los procesos de detoxificación de herbicidas. La naturaleza de estos conjugados suele ser muy diversa, con azúcares, aminoácidos, péptidos y lignina como grupos orgánicos y enlaces de tipo éster, éter, tioéter, amida o glucosídico.

- *Conjugación con glutatión:* constituye un mecanismo de detoxificación de gran importancia en muchos tejidos vegetales. Se trata de una sustitución nucleofílica en la que el anión glutatión GS⁻ sirve de nucleófilo, actuando los grupos cloro, p-nitrofenol o alquil-sulfóxido como posibles grupos a sustituir en la molécula de herbicida (Lamoureux y Fear, 1979). La conjugación con el tripéptido glutatión está catalizada por una familia de enzimas denominadas glutatión -S-transferasas más o menos específicas que encuentran de manera constitutiva o inducible en muchos tejidos vegetales (Devine et al., 1993).
- *Conjugación con aminoácidos:* De forma general la hidrólisis de glutatión en este tipo de conjugados suele producir un conjugado de cisteína que puede ser posteriormente malonizado. Sin embargo, en el caso del herbicida clorfemprop sólo se ha descrito en trigo el conjugado de cisteína, y no el de glutatión (Pont y Collet, 1980), siendo

posible que la cisteína pueda actuar como nucleófilo en una reacción de conjugación similar a la descrita en el glutatión.

- *Conjugación con azúcares*: Los conjugados glucósidos más frecuentes en plantas son los β -D-glucopiranosidos junto con los N-glicósidos, O-glucósidos y ésteres de glucosa. Este tipo de reacciones están catalizadas por glucosil-transferasas que utilizan UDP-glucosa como donante de glucosa (Mansager et al, 1983). De todas estas reacciones, la formación de O-glucósidos es la más común. Esta formación sigue normalmente a la introducción de grupos hidroxilo en la molécula de herbicida por monooxigenación e implica la conjugación del herbicida o de sus metabolitos con un azúcar, aminoácido o glutatión, incrementando su solubilidad en agua y reduciendo la toxicidad del compuesto. Generalmente, los metabolitos formados en la fase II tienen poca o nula fitotoxicidad y pueden ser almacenados en orgánulos celulares.

Fase III (Deposición). La ruta metabólica seguida por un herbicida afecta en gran manera el uso de los metabolitos final. Los conjugados glucósidos se depositan en la vacuola donde quedan almacenados, mientras que los conjugados de origen aminoácido se excretan a la pared celular donde se integran en el componente de lignina de aquélla, formando un residuo insoluble (Pillmoor y Caseley, 1984). Es decir, esta fase implica la transformación de los metabolitos de la fase anterior en conjugados secundarios con nula toxicidad (Hatzios, 1991).

Esta división no constituye una regla general, dado que alguna de las fases puede no estar presente en los procesos de detoxificación. La molécula de herbicida puede ser un proherbicida inactivo que debe ser enzimáticamente convertido en un compuesto activo. A veces, ciertos procesos de conjugación son de carácter reversible, por lo que sólo afectan de manera parcial a la cantidad de herbicida libre intracelular.

La resistencia a herbicidas por detoxificación es un proceso muy frecuente. Sin embargo, este mecanismo suele estar asociado a fenómenos de resistencia cruzada, lo que implica que un mismo individuo tiene la capacidad de metabolizar moléculas muy diferentes pertenecientes a diversas familias químicas. Esta moderada resistencia a un amplio espectro de productos hace extremadamente difícil el control de estos biotipos de malas hierbas únicamente con métodos químicos.

1.4.3. Desarrollo de cultivares resistentes a Imidazolinonas (IMI)

El descubrimiento de especies silvestres tolerantes a inhibidores de la ALS ha permitido el desarrollo y comercialización de cultivos tolerantes a imidazolinonas (IMI). Esta tolerancia ha sido incorporada a través de métodos convencionales de mejoramiento, siendo por tanto semillas no transgénicas (Pfeninng et al., 2008), y se conoce con el nombre de tecnología Clearfield®. En la actualidad son cultivadas variedades de maíz, colza, arroz, trigo y girasol tolerantes a imidazolinonas (Tan et al., 2005).

En la década de los 80, se iniciaron investigaciones encaminadas a obtener cultivares resistentes a estas materias activas aprovechando la propiedad que presentaban algunas malas hierbas para adquirir resistencia a herbicidas gracias a mutaciones naturales (BASF Corporation, 2014) y, en el año 2012, apareció en el mercado estadounidense el primer cultivo de maíz resistente.

Uno de los temas de discusión de esta tecnología es el control del flujo de genes de resistencia en los sistemas agrícolas. Esta situación nos ha permitido un incremento significativo en el área de siembra, tanto en el cultivo de trigo como de arroz, así como ocurre en otros cultivos, debido al riesgo de que estos genes sean diseminados en malezas emparentadas con estos cultivos (Gressel y Valverde, 2009).

La falta de un sistema de vigilancia estricta para las prácticas de manejo en el uso de cultivares genéticamente modificados resistentes a herbicidas en la producción agrícola, así como los obtenidos por mutación génica, propicia las condiciones para la ocurrencia de efectos indeseables a nivel del ecosistema. De acuerdo a Ashigh et al., (2008), el flujo de genes puede contribuir a la aparición de resistencias en malas hierbas en ausencia de la presión de selección impuesta por el herbicida.

La rotación de cultivos, combinación de distintos sistemas de labranza, monitoreo de los lotes y limpieza de la maquinaria serían útiles, no sólo sobre malas hierbas resistentes sino como estrategia de manejo integrada para minimizar la probabilidad de surgimiento de resistencia (Powles et al., 1997; Barberi, 2004; Green, 2004; Shaner y Beckie, 2014), además de la implementación de alternativas de control que impliquen el uso de herbicidas con diferentes sitios de acción.

Aunque, el sistema Clearfield®, mediante combinación de cultivos IMI-resistentes con herbicidas IMI, es capaz de controlar ciertas malas hierbas que otros herbicidas no pueden controlar en algunos cultivos (como es el caso de *Aegilops cylindrica* Host, que constituye un problema para la producción de trigo de invierno en EEUU). Antes de que fuera desarrollado el trigo IMI tolerante, no se había registrado que controlara de manera selectiva esta mala hierba sin que le causara daños al trigo (Anderson et al., 2004).

Asimismo, la tecnología Clearfield® provee el más amplio control de malezas desde la siembra hasta la cosecha con una sola aplicación de herbicida (Colquhoun et al., 2003). Cada herbicida de la familia Clearfield® está diseñado especialmente para proveer una excepcional actividad en post-emergencia para controlar malezas en cultivos específicos.

Un aspecto clave es que estos herbicidas afectan a una enzima que se encuentra solamente en plantas y no en animales, pájaros, peces o insectos. Esta selectividad combinada con dosis bajas de aplicación hace que los herbicidas Clearfield® sean altamente compatibles con el medio ambiente.

1.4.4. Mecanismos de resistencia de trigo Clearfield® a herbicidas imidazolinonas

En el caso del trigo “Fidel” fue la primera variedad de trigo de invierno utilizada (Anderson et al., 2004) con una mutación que le aportaba resistencia a imazetapir (Newhouse et al., 1992; Ball et al., 1999). La última resistencia inducida en el cultivo del trigo fue al herbicida imazamox (Seefeldt et al., 1998), pero no fue hasta el año 2000 cuando estos cultivares empezaron a comercializarse bajo la denominación Clearfield® (BASF Corporation, 2014).

En España en el año 2004, se comercializó por primera vez el girasol Clearfield ofreciendo una solución novedosa en el control de *Orbanche* sp. (Jopo) (Tomás-Alvear, 2007).

El trigo IMI-resistente fue desarrollado por mutagenesis de una población de semillas de trigo (cv. Fidel), estas semillas fueron seleccionadas mediante tratamiento con imazetapir [ácido 5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin 2 il) nicotínico] seguido por una

aplicación en pre-emergencia con el mismo herbicida. Cuatro plantas resistentes fueron seleccionadas y nombradas como selección primitiva Fidel (FpS) repitiéndose este mismo tratamiento desde la descendencia 1 a la 4, obteniéndose así la selección Fidel (FS).

El trigo de invierno tiene tres genes de AHAS homólogos que se encuentran en los brazos largos de los cromosomas 6DL (AHASL 1D) llamados *imi* los cuales presentan una sustitución de aminoácidos (Ser653 por Asn) en el dominio E, que confiere una alta resistencia sólo a herbicidas de imidazolinonas (Pozniak et al., 2004). La FS-4 tiene la mutación *imi1* y ha sido usado como donante para el mejoramiento de cultivares de trigo resistentes a imidazolinonas (Tan et al., 2005). Estos genes que confieren la resistencia han sido transferidos al cultivo mediante mejora clásica, dando lugar a nuevos híbridos comerciales denominados Clearfield® (Miller y Al-Khatib, 2002; Zollinger, 2003).

Las especies sensibles metabolizan este herbicida lentamente o bien no lo metabolizan. Los estudios realizados por Fischer et al. (2000) usando inhibidores del citocromo P₄₅₀ (EC 1.12.12.1, P_{450s}) presentaron a este como un mediador en la degradación del herbicida a través de su actividad monooxigenasa la cual permite la hidroxilación del compuesto a partir de un paso previo a la oxigenación.

La resistencia a imidazolinonas mediante metabolismo ha sido estudiada en *Myriophyllum spicatum*, soja, alfalfa, algunas especies de leguminosas (Ohba et al., 1997; Bukum et al., 2012) y *triticum* (Rojano et al., 2015). Según los estudios anteriores, diferentes rutas metabólicas podrían estar involucradas, dependiendo de la estructura del anillo (pirimidina, benzeno o quinolona) y de los sustituyentes del herbicida en cuestión. En especies tolerantes/resistentes el metabolismo de imazamox ocurre por una hidroxilación del carbón en posición α del sustituyente 5- metoximetil del anillo de piridina, seguido por la conjugación con una molécula de glucosa (Ohba et al., 1997; Rojano et al., 2015).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es estudiar la resistencia a nuevos herbicidas en trigo Clearfield® como herramienta alternativa de control de malas hierbas (*L. rigidum*).

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Evaluar el efecto de diferentes dosis de imazamox y glufosinato en cultivares de trigo Clearfield®.

2.2.2. Establecer los niveles de resistencia de los cultivares de trigo IMI-resistentes y sensible a imazamox y glufosinato, mediante:

2.2.2.1. Ensayos dosis-respuesta en diferentes cultivares a distintas dosis de herbicidas en invernadero.

2.2.2.2. Ensayos de inhibición de ALS y GS para determinar los niveles de resistencia.

2.2.3. Estudiar los mecanismos de resistencia de los cultivares de trigo para establecer la causa principal de la resistencia:

2.3.3.1. Retención foliar de los herbicidas.

2.3.3.2. Absorción/translocación de imazamox y glufosinato.

2.3.3.3. Metabolismo de imazamox y glufosinato.

2.3.3.4. Secuenciación de ALS.

2.2.4. Evaluar el herbicida imazamox en el control de malas hierbas (*L. rigidum*) en trigos de primavera.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Para la realización de este trabajo, se han utilizado semillas de dos variedades de trigo diferente (*Triticum aestivum* y *Triticum durum*), además de una variedad de *Lolium* (*L. rigidum*). Para el caso de *T. aestivum* se utilizaron cuatro cultivares, uno de los cuales es un cultivar resistente (Rafalín) al tratamiento con imazamox, y dos de ellos (Pantera y Anza) poseen múltiple resistencia a imazamox + glufosinato, el otro cultivar utilizado como control sensible fue Gazul. Para la otra variedad (*T. durum*) los dos cultivares utilizados fueron Simeto como cultivar sensible y Antoñín como resistente a imazamox.

El cultivar Rafalín procede del cruzamiento de Pantera (R) x Gazul (S) realizado en trabajos anteriores por el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo el presente trabajo y el cual posee dos mutaciones ya conocidas (*imi1* e *imi2*) descritas por Jiménez et al., 2016). Las líneas Anza y Pantera provienen del cruzamiento del cultivar T-590 resistente a glufosinato (IAS/CSIC-Córdoba, España) x Pantera Clearfield® resistente a imazamox (INIA-Carillanca, Chile). La línea T-590 contiene el gen *bar* (resistente a bialofos) que codifica la enzima PAT (Rojano-Delgado et al., 2013); mientras que Pantera posee las mutaciones descritas por Jiménez et al., (2016) en la posición Ser-653-Asn. Por otro lado, el biotipo resistente de *Triticum durum* (Antoñín) viene de un cruzamiento de Simeto (S) x *Tritordeum* y presenta la mutación *imi1* (Rodríguez-Suárez et al., 2009). El *Tritordeum*, a su vez, procede del cruzamiento de un *Triticum durum* con una cebada silvestre chilena. La obtención de Antoñín, Anza y Pantera, así como del *Tritordeum* han sido gracias al trabajo realizado por el mejorador Prof. Dr. Antonio Martín (CSIC-Córdoba).

3.2. Herbicidas utilizados y sus características

3.2.1. Imazamox

El imazamox (Figura 8), Ácido (RS)-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il)-5-metoximetilnicotínico, es un herbicida de la familia de las imidazolinonas que inhibe la enzima acetolactato sintasa (ALS). Se usa en aplicaciones de post emergencia en dosis de 35-45 g ia ha⁻¹, para el control de malas hierbas gramíneas y de hoja ancha. El formulado

Pulsar 40 SC (Imazamox 4% p/v SL) y el Imazamox de grado técnico (96,5% pureza) utilizados, fueron suministrados por BASF.

Este herbicida sistémico es absorbido rápidamente por la parte aérea de las plantas, mientras que la absorción radicular es menor, translocándose por el xilema y el floema. Detiene el crecimiento de plantas susceptibles pocas horas después del tratamiento y los síntomas aparecen 1-2 semanas después, presentando áreas meristemáticas cloróticas seguida por un desarrollo lento de clorosis y necrosis foliar general. Las malas hierbas susceptibles lo metabolizan lentamente o incluso pueden no metabolizarlo (Shaner, 2014).

Algunas de las propiedades físicas y químicas del producto son:

- Peso molecular: 322,4 g mol⁻¹.
- Fórmula molecular: C₁₅H₁₉N₃O₄.
- Estado físico: sin olor, sólido (polvo).
- Densidad: 1,39 g mL⁻¹ a 20°C.
- Solubilidad: Muy soluble en agua.

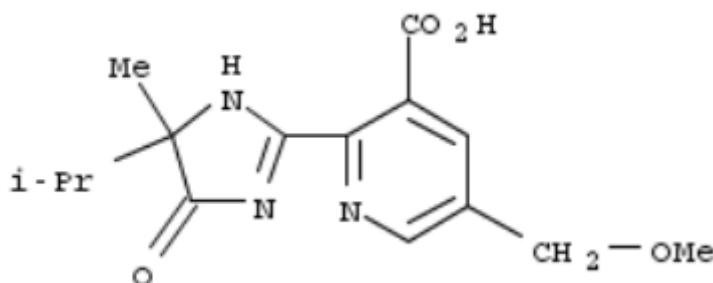


Figura 8. Estructura del imazamox.

3.2.2. Glufosinato

El glufosinato (Figura 9), 4-[hidroxi(metil)fosfinoil]-DL-homoalaninato de amonio, es un herbicida sistémico no selectivo postemergente. Desde el punto de vista biológico el glufosinato de amonio es un análogo natural del ácido glutámico. Este análogo se usa para una gran variedad de malezas de hoja ancha y para pastos con árboles frutales u orquídeas, viñedos, plantaciones de caucho y palma, árboles ornamentales y tierras no cultivadas, además de en cultivos de vegetales antes de la germinación.

El principal mecanismo de acción del glufosinato es mediante inhibición de la glutamina sintasa (GS). El herbicida se une al ATP formando un complejo glutamino sintetasa-glutamino fosfato con el cual el NH_3 no puede reaccionar, quedando la enzima inhibida irreversiblemente provocando una disminución en los niveles de ácido aspártico y asparragina, entre otros fenómenos. El flujo de electrones en la fotosíntesis se ve inhibido por la disminución de los grupos amino que provee el ácido glutámico los cuales los utiliza el glioxilato en el peroxisoma. El glioxilato se acumula reduciendo la fijación del CO_2 en el ciclo de Calvin, inhibiendo la fase luminosa de la fotosíntesis. En presencia de luz, la inhibición del flujo de electrones produce clorofila en estado triplete (estado inestable altamente energético) lo que conlleva la peroxidación de lípidos y el daño irreversible de las membranas biológicas. Además de acumularse el glutamato también lo hace el amonio, ya que es una ruta de fijación de nitrógeno en plantas, inhibiéndose la fosforilación en la fotosíntesis (Tachibana et al., 1986; Sauer et al., 1987; Hoerlein, 1994).

Algunas de sus características principales son:

- Peso molecular: $198,2 \text{ g mol}^{-1}$.
- Fórmula molecular: $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$.
- Estado físico: Polvo cristalino de color blanco a amarillo claro, con olor ligeramente picante.
- Densidad: 1.4 g mL^{-1} a 20°C .
- Solubilidad en agua: $1370 \text{ g/L } (\pm 11)$ a 22°C .

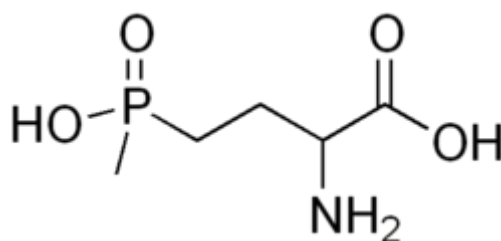


Figura 9. Estructura química del glufosinato.

3.3. Condiciones de crecimiento

Las semillas se colocaron en placas Petri de 9 cm de diámetro con una base de papel de filtro y 5 mL de agua destilada. Se mantuvieron a 4°C en la oscuridad durante 48h. Tras este periodo de bajas temperaturas y ausencia de luz, las semillas se llevaron a cámara de crecimiento hasta su germinación con una temperatura de 27°C durante el día y 14°C durante la noche, siendo el fotoperiodo de 14/10 horas (luz/oscuridad). Las semillas, previamente germinadas, se colocaron en macetas con capacidad de 1L que contenían una mezcla (1:1) de turba y arena como sustrato. Tras el trasplante fueron trasladadas al invernadero donde las plantas crecieron a 25-28/12-14°C día/noche; con un fotoperiodo de 16 horas y 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz suplementaria. Una vez las plantas alcanzaron un estado de crecimiento correspondiente a 3-5 hojas, se realizaron los tratamientos con herbicidas.

3.4. Ensayos de dosis-respuesta

Estos ensayos se realizaron para determinar los niveles de resistencia a imazamox e imazamox + glufosinato de los cultivares de trigo IMI-resistentes, además del cultivar sensible y la población de *Lolium rigidum*. Para ello se evaluó la ED₅₀ (dosis de herbicida a la cual el crecimiento de la planta se ve reducido en un 50% respecto al control). Cuando las plantas de los diferentes cultivares alcanzaron la etapa de desarrollo de 3-5 hojas se aplicaron con el producto formulado Pulsar® 40 SC (imazamox 4% p/v, BASF) a las dosis de 0, 40, 80, 120, 160 y 240 g ia; de igual modo las dosis de la mezcla de imazamox + glufosinato (Finale®, 15% p/v, Bayer Hispania S. L.) usadas fueron: 0+0, 20+200, 40+400, 60+600, 80+800, 100+1000 y 120+1200 g ia ha⁻¹ para Anza y Pantera y 0+0, 0.25+2.5, 1+10, 20+200 y 30+300 g ia para la variedad Gazul. En todos los tratamientos se añadió Dash® (34,5% p/v metil oleato/metil palmiato), en dosis de 1,25 L ha⁻¹ como coadyuvante. Para la aplicación de estos tratamientos se utilizó una máquina de aplicación experimental de herbicida (Devries Manufacturing, Hollandale, Minnesota, USA), equipada con boquillas de abanico plano Tee Jet 80.02 EVS (abertura uniforme de 80° y un volumen de 0,76 L min⁻¹), ajustada a 200 kPa y volumen de aplicación en campo de 250 L ha⁻¹.

Se realizaron diez repeticiones de cada uno de los ensayos. Una vez realizados los tratamientos, las plantas permanecieron durante 24h a temperatura ambiente antes de ser

trasladadas al invernadero. Pasados 30 días se procedió a cortar la parte aérea de la plántula para realizar el pesaje de las mismas y cuantificar el peso fresco.

Los pesos frescos fueron expresados en porcentajes respecto al control no tratado.

Se determinó la ED_{50} en todos los cultivares utilizando un modelo de regresión no lineal descrito por Rojano-Delgado et al., (2012) usando el paquete estadístico Sigma Plot 10.0.

$$Y = L + \{(U - L) / [1 + (x / ED_{50})^b]\}$$

Donde Y es el peso fresco expresado en porcentaje respecto a las plantas no tratadas, U y L son coeficientes que pertenecen a las asíntotas inferior y superior, respectivamente, b es la pendiente de la curva, ED_{50} es la tasa efectiva requerida para reducir el peso fresco de la planta en un 50% y x (variable independiente) es la dosis del herbicida.

Los valores de ED_{50} correspondientes a cada cultivar fueron usados para calcular el factor de resistencia (FR) de cada herbicida, obtenido como el cociente de la ED_{50} del cultivar R entre la ED_{50} del S ($FR = ED_{50}R / ED_{50}S$).

3.5. Estudio de retención foliar

Los ensayos de retención foliar del herbicida se realizaron siguiendo el método adaptado por Jiménez et al., (2005), mediante el cual se pulverizaron las plantas con una solución de imazamox a dosis de 40 g ia ha⁻¹ y de 40+400 g ia ha⁻¹ de imazamox + glufosinato (IMA+GLU), a ambas soluciones se le añadió un coadyuvante Dash[®] (34,5% p/v metil oleato/metil palmiatato), en dosis de 1,25 L ha⁻¹ + un indicador visual (100 mg de fluoresceína por litro de NaOH 5 mM). Diez plantas de cada cultivar en estado de crecimiento de 3-5 hojas fueron pulverizadas, utilizando el mismo equipo de aplicación que en los ensayos de dosis respuesta descrito anteriormente.

Una vez secas las hojas (25-30 min), se cortaron las plantas a nivel de suelo por lotes de 10 y se colocaron, individualmente, en Erlenmeyers que contenían 50 mL de NaOH 5 mM cada uno para, posteriormente, agitarlas durante 30 segundos y de ese modo eliminar los posibles restos de herbicida y de colorante que pudiera quedar en el tejido foliar.

Se realizaron las lecturas de las soluciones de lavado mediante un espectrofluorímetro (F-2500, Hitachi, Japón) a una longitud de onda de excitación de 490 nm y 510 nm para emisión.

Los tejidos cortados fueron empaquetados en sobres de celulosa y secados en un horno a 80°C durante 72 horas. La retención fue expresada en μL de imazamox y en μL (IMA + GLU) por gramo de materia seca respectivamente.

3.6. Estudio de absorción y translocación de ^{14}C -imazamox y ^{14}C -glufosinato

Las pruebas de absorción y translocación de cada uno de los herbicidas se llevaron a cabo por separado. Tanto el imazamox como el glufosinato marcados con ^{14}C se mezclaron con su fórmula comercial (Pulsar[®] 40 y Finale[®], respectivamente) para preparar una solución con una actividad específica de 0.834 kBq μL^{-1} . Las concentraciones finales correspondieron a 40 g ai ha⁻¹ de imazamox (+ 1.25 L ha⁻¹ de Dash HC) y 450 g ai ha⁻¹ de glufosinato, ambos en un volumen de aplicación de 250 L ha⁻¹. Las plantas con 3-4 hojas verdaderas (tratadas con 1 μL de solución de herbicida correspondiente a 0.834 kBq planta⁻¹) se manipularon de acuerdo con Hatami et al. (2016). Para analizar el porcentaje de absorción y translocación, las plantas tratadas fueron cuidadosamente extraídas de la maceta y lavadas 3, 6, 12, 24, 48 y 96 h después del tratamiento (HDT) para imazamox, y a 6, 12, 24, 48 y 72 HDT para glufosinato. Los herbicidas no absorbidos fueron eliminados con solución de lavado de 3 mL de agua-acetona (9:1 v/v).

Posteriormente, las plantas fueron separadas en hoja tratada, resto de planta y raíz. La solución de enjuague fue mezclada con 2 mL de líquido de centelleo (Ready Safe TM[®], Beckman Coulter) y analizada por el detector LSC (Contador de centelleo, Beckman LS 6500). Las muestras de las plantas fueron colocadas en una estufa a 60°C durante 96h y después fueron combustionadas usando un oxidador biológico (Packard Tri Carb 307). El CO₂ producido en la combustión fue retenido en 18 mL de una mezcla de Carbo-Sorb E y Permafluor (9:9 v/v) (Perkin-Elmer, BV Bioscience Packard). La radioactividad se cuantificó mediante LSC, y el porcentaje del herbicida absorbido se expresó como [KBq tejido oxidado mediante combustión / (KBq tejido oxidado mediante combustión + KBq obtenidos en el lavado)] x 100. Se realizaron tres repeticiones (3 plantas por repetición) y el experimento se realizó completamente al azar.

La translocación de ^{14}C -imazamox y ^{14}C -glufosinato se visualizó utilizando un generador de imágenes de fósforo (Cyclone, Perkin Elmer, Packard Bioscience BV). Para ello las plantas tratadas con 1 μL de solución de herbicida no se separaron, sino que se dejaron enteras. Se lavaron y se fijaron en papel de filtro (25 x 12,5 cm), se secaron a temperatura

ambiente durante 4 días y se colocaron durante 6 h junto a una película de almacenamiento de fósforo para visualizar el herbicida ^{14}C mediante un generador de fósforo (Cyclone, Perkin-Elmer y Packard Bioscience BV). El experimento se llevó a cabo utilizando tres plantas de cada variedad en cada intervalo de tiempo.

3.7. Estudio del metabolismo de imazamox

Para este estudio se siguió la metodología descrita por Rojano-Delgado et al., (2015). Diez plantas de cada cultivar de trigo se trataron con imazamox a 40 g ai ha^{-1} (dosis de campo) como en los ensayos de dosis-respuesta. Conjuntamente, un grupo de 10 plantas de cada cultivar fueron tratadas con malation ($1000 \text{ g ai ha}^{-1}$) 1 h antes de la aplicación con imazamox, para evaluar si el citocromo P_{450} (Cit- P_{450}) estaba involucrado en el metabolismo del imazamox. Un grupo de plantas se mantuvo como control. Las plantas tratadas con herbicida y los controles se cortaron 96 horas después del tratamiento y lavándose con 60 mL de agua destilada para eliminar el imazamox y los residuos del suelo en la superficie de la hoja. Finalmente fueron almacenadas a -40°C hasta su posterior estudio. Las muestras fueron homogeneizadas en un mortero de porcelana utilizando nitrógeno líquido. A continuación, 500 mg de cada muestra se mezclaron con 10 mL de metanol-agua (9:1 v / v), y los metabolitos se extrajeron mediante ultrasonidos a 70 W de potencia durante 10 min. El sobrenadante se separó por centrifugación (15 min a 15000 rpm) y se evaporó a sequedad bajo una corriente de aire. El residuo sólido de esta fracción se reconstituyó en 500 μL de metanol-agua (9:1 v / v) y se filtró a través de un filtro de jeringa de nylon de 45 μm de tamaño de poro y 13 mm diámetro interno (Millipore Carrigtwohill, Irlanda), antes del análisis cromatográfico.

Tanto para la identificación como para la determinación de imazamox y sus metabolitos en extractos de planta, se utilizó cromatografía de líquidos y detección por UV-Vis usando un detector de fotodiodos en fila (DAD). Se utilizó una columna C18 (20 cm x 4,6 cm, con un tamaño de partícula de 3 micras) tanto para la identificación como para la determinación.

50 μL de la fase reconstituida se inyectaron en el equipo usando una fase móvil compuesta por ácido acético 1% (v/v) en agua como fase móvil A, y metanol puro como fase móvil B. El programa de elución utilizado comienza con un 5% de fase móvil B y continua con el siguiente gradiente lineal. Paso 1: 5 a 20% de metanol durante 10 min; Paso 2: 20 a 80% de metanol durante 10 min; Paso 3: 80 a 100% de metanol durante 10 min y Paso 4:

100 a 5% de metanol durante 10 min. La velocidad de flujo se mantuvo constante junto con la temperatura de la columna a 1 mL min⁻¹ y 40°C, respectivamente.

3.8. Acumulación de amonio

Se colocaron 50 mg de discos foliares (5 mm de diámetro) de las hojas más jóvenes en tubos de 1.5 mL con 200 µL de diferentes concentraciones de glufosinato de grado técnico (0, 6.5, 12.5, 25, 50, 100, 200 y 300 µM) diluidas en el medio sacarosa / Tween 20. Los tubos se sellaron con cinta de microporos y se colocaron en una cámara de incubación a 18 °C con intensidad lumínica de 150 mmol m⁻² s⁻¹ durante 24 h, y 60% de humedad relativa. La acumulación de amoníaco en las plantas de trigo R y S se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Dayan et al. (2015). La absorbancia de las muestras se midió con un espectrofotómetro a 630 nm. Los experimentos se repitieron dos veces evaluando tres muestras (cada una con tres repeticiones técnicas) por concentración de glufosinato de cada línea de trigo. El contenido de amonio se determinó usando cloruro de amonio como estándar (Sigma Aldrich, España). Los datos de la acumulación de amoníaco se expresaron como porcentaje de amonio respecto del control.

3.9. Estudios de la actividad ALS

La actividad ALS se determinó siguiendo la metodología utilizada por Hatami et al., (2016) con ligeras modificaciones. Se tomaron muestras de tres gramos de tejido foliar y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido. Posteriormente, las muestras se homogeneizaron en un mortero usando 5 mg de polivinilpirrolidona (PVPP). A continuación, se agregó un tampón de extracción compuesto por fosfato potásico 1 M (pH 7.5), piruvato de sodio 10 mM, Cl₂Mg 5 mM, pirofosfato de tiamina 50 mM, dinucleótido de flavina adenina 100 µM (FAD), ditiotreititol 12 mM y glicerol (1: 9 v / v). La solución se agitó durante 10 minutos a 4 ° C. El homogeneizado se filtró a través de gasa de algodón y se centrifugó (20000 rpm durante 20 min). El sobrenadante que contenía un extracto enzimático de ALS se usó inmediatamente para los ensayos enzimáticos. Para analizar la actividad de ALS, se añadieron 90 µL de extracto de enzima a 110 µL de tampón de ensayo recién preparado (solución de tampón fosfato potásico 0.08 M (pH 7.5), piruvato de sodio 0.5 M, Cl₂Mg 0.1 M, pirofosfato de tiamina 0.5 mM y 1 µM FAD). Luego, se agregaron concentraciones crecientes de imazamox en grado técnico (0, 0.1, 1, 5, 10, 50, 100 y 1000 µM). La mezcla se incubó durante 60 min a 37 ° C. La reacción se detuvo después de la adición de 50 µL de H₂SO₄ y se incubó a 60 ° C durante 15 minutos.

Finalmente, se añadieron 250 μL de una solución recién preparada de creatina en agua (5 g L^{-1}) y 250 μL de una solución de naftol en hidróxido sódico ($50 \text{ g L}^{-1} \text{ NaOH } 5 \text{ M}$). Se incubó de nuevo a 60°C durante 15 minutos para facilitar la descarboxilación de acetolactato a acetoína.

Se determinó la absorbancia a 520 nm usando un espectrofotómetro (Beckman Coulter, DU 640). Los valores de absorbancia se transformaron en valores de concentración de acetoína usando el coeficiente de extinción molar obtenido a partir de la curva patrón de acetoína. La actividad ALS fue medida mediante la estimación de la cantidad de acetolactato convertida en acetoína, la cual fue detectada como un complejo coloreado y medida en el espectrofotómetro. Dicha actividad se expresó en porcentaje respecto al control sin herbicida (x).

La concentración de herbicida requerida para inhibir la actividad ALS al 50% (I_{50}) se calculó a partir de gráficas lineales comparando porcentajes de inhibición frente al logaritmo de la concentración del herbicida, como previamente habían descrito Osuna y De Prado (2003). El factor de resistencia se calculó como $I_{50}(\text{R}) / I_{50}(\text{S})$.

3.10. Estudio de la actividad GS

La actividad de GS se determinó in vitro usando extractos de hojas jóvenes procedentes de tres líneas de trigo (5 g de tejido de cada una) tal y como se describe en Rhodes et al. (1975). Se utilizaron las concentraciones de glufosinato técnico (2-amino-4-(hidroximetilfosfinil) butírico, sal de amonio, 95% de pureza, Sigma Aldrich, España) en concentraciones de 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 y 300 μM . La absorbancia de las muestras se midió en el espectrofotómetro a 540 nm. El contenido total de GS se midió usando el método de Bradford (Bradford, 1976). La actividad específica GS ($\text{nmol de glutamina mg}^{-1} \text{ de proteína h}^{-1}$) se determinó en ausencia de herbicida.

Los experimentos se repitieron dos veces evaluando tres muestras (cada una con tres repeticiones técnicas) por concentración de herbicida de cada línea de trigo.

3.11. Estudio de mutaciones en el gen ALS

El análisis de secuencias se realizó mediante el método de Sanger en la unidad de genómica del Servicio central de apoyo a la investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

Para la extracción de ADN se utilizaron 100 mg de material vegetal procedente de hojas jóvenes previamente congelado en Nitrógeno líquido y conservado a - 80°C hasta su procesamiento. Las muestras se homogeneizaron en mortero con Nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. A continuación, la extracción y purificación de ADN se realizó con el Kit DNeasy Plant mini kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. En total se analizaron 10 individuos de cada cultivar de *Lolium* y trigo.

Para las reacciones de secuenciación se amplificaron mediante PCR dos regiones del gen de la ALS en las que previamente se han descrito mutaciones que confieren resistencia. Las condiciones de PCR y los primers utilizados fueron los descritos por Liu et al. (2013) para *Lolium* y en el caso de trigo se utilizaron los primers usados por Pozniak et al. (2004). Los productos de PCR fueron purificados con el kit de Qiagen “QIAquick PCR Purification Kit”. Una vez purificadas las muestras se enviaron al SCAI para su secuenciación.

3.12. Análisis estadístico

Los datos de los ensayos de reducción de peso fresco y actividad enzimática se expresaron como porcentaje respecto del control y se sometieron a análisis de regresión no lineal para determinar la dosis de Imazamox e IMA + GLU necesaria para reducir el peso fresco (ED_{50}) y para inhibir la enzima (ALS o GS) actividad (I_{50}) en un 50% de cada cultivar usando la ecuación log-logística: $Y = c + \{(d-c) / [1 + (x / g)^b]\}$; donde Y es el porcentaje de peso fresco o la reducción de la actividad enzimática (ALS o GS) con respecto al control, c y d son las asíntotas inferior y superior, b es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, g la dosis de herbicida en el punto de inflexión (es decir, ED_{50} o I_{50}), y x (variable independiente) es la dosis de herbicida. Los análisis de regresión se realizaron usando el paquete *drc* con el programa R versión 3.2.5 (Ritz et al. 2015) y SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc. EE. UU.).

Los datos de retención foliar, absorción y translocación de ^{14}C -imazamox y ^{14}C -glufosinato se sometieron a ANOVA. Para cada análisis, se evaluaron suposiciones tales como igualdad de varianza y distribución normal. Se realizó un análisis estadístico utilizando el software Statistix (versión 9.0) de Analytical Software (EE. UU.).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Ensayos de dosis-respuesta

Se confirmó la resistencia a imazamox en los dos nuevos cultivares de Rafalín y Antoñín. Los datos de los pesos frescos de las plantas se ajustan bien al modelo log-logístico de regresión no lineal, lo que permite estimar las dosis medias efectivas que redujeron el peso fresco en un 50% (ED_{50}). Los cultivares de trigo blando presentaron valores de ED_{50} de 2.4 y 224.8 g ai ha⁻¹ para imazamox en Gazul y Rafalín, respectivamente. Además, los ED_{50} de los cultivares de trigo duro fueron 3.6 y 157.2 g ai ha⁻¹ para Simeto y Antoñín, respectivamente. Los factores de resistencia (FR) de los cultivares R fueron 43.7 y 93.7 para Antoñín y Rafalín, respectivamente, en relación con sus correspondientes cultivares S (Figura 10, Tabla 6).

De acuerdo con los intervalos de confianza (IC) del 95%, los cultivares S no mostraron diferencias significativas en los parámetros ED_{50} entre ellos. Independiente de la variedad de trigo, el cultivar Rafalín es el que soporta una mayor dosis de imazamox.

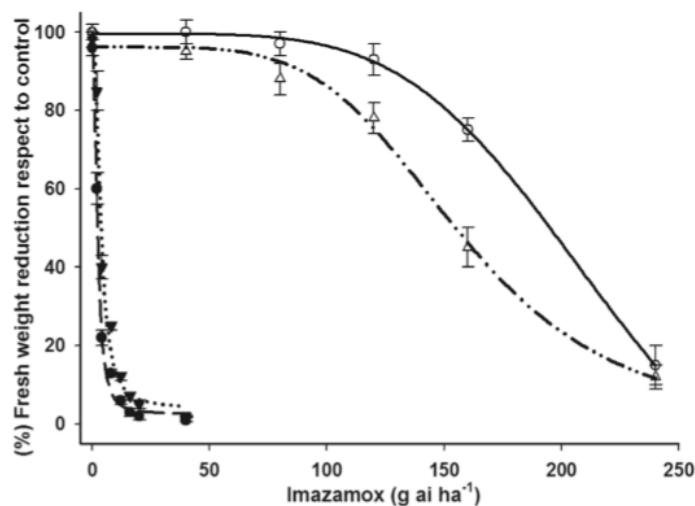


Figura 10. Curvas de dosis-respuesta de la reducción de peso fresco con respecto a las plantas control no tratadas de cultivares susceptibles y resistentes a imazamox de las diferentes variedades de trigo blando (*Triticum aestivum*) y duro (*Triticum durum*) evaluadas 30 días después del tratamiento. Barras verticales \pm error estándar (n = 10).

Tabla 6. Parámetros de la ecuación sigmoïdal utilizada para estimar la dosis de imazamox (g ai ha⁻¹) necesaria para reducir el peso fresco de una población en 50% (ED₅₀) en cultivares de trigo susceptibles y resistentes de trigo blando (*Triticum aestivum*) y duro (*Triticum durum*).

Variedad	Cultivar	c	d	b	R ² aj	P-valor	ED ₅₀ (IC95)	FR
Blando	Rafalín (R)	99.5	-0.6	4.7	0.99	<0.0001	224.8 (17.6)	93.7
	Gazul (S)	96.2	2.4	2.26	0.99	0.0011	2.4 (0.6)	---
Duro	Antoñín (R)	96.2	0.4	4.7	0.98	0.0176	157.2 (12.9)	43.7
	Simeto (S)	99.9	4.1	2.2	0.97	0.0072	3.6 (1.1)	---

c = límite inferior, d = límite superior, b = pendiente, R² aj = 1 - (sumas de cuadrados de la regresión / sumas totales de cuadrados corregidas). FR = Factor de resistencia = ED₅₀R / ED₅₀S. Los valores IC95 son los límites superior e inferior (±) de los intervalos de confianza del 95% (n = 10).

Igualmente, la resistencia a imazamox + glufosinato se confirmó en las líneas de trigo Anza y Pantera (Figura 11a). Gazul presentó valores de ED₅₀ de 3.4 y 34.3 g ai ha⁻¹ de imazamox y glufosinato, respectivamente. Con base en estos valores, el factor de resistencia (FR) de las líneas R fue de 15.1 y 27.9 para Anza y Pantera, respectivamente, con respecto a la variedad Gazul (Tabla 7). Además, ambas líneas de trigo R sobrevivieron a una aplicación independiente a 40 + 750 g ai ha⁻¹ de IMA + GLU (dosis recomendadas), respectivamente, mientras que la variedad S se vio gravemente afectada (Figura 11b).

Tabla 7. Parámetros de la ecuación sigmoïdal utilizada para estimar la dosis (g ai ha⁻¹) de la mezcla imazamox (IMA) + glufosinato (GLU) necesaria para reducir el peso fresco en un 50% (ED₅₀) en líneas de trigo blando susceptible y resistente (*Triticum aestivum*).

Variedad	ED ₅₀ (IC95%)		c	d	b	R ² aj	FR
	IMA	GLU					
Gazul	3.4 (0.75)	34.3 (7.53)	99.35	-1.43	1.38	0.99	--
Anza	51.7 (8.28)	517.3 (82.87)	95.78	2.48	2.96	0.95	15.1
Pantera	95.8 (14.57)	958.2 (145.72)	99.76	1.42	1.00	0.95	27.9

$Y = c + \{(d-c) / [1 + (x / g)^b]\}$ donde; Y = porcentaje de peso fresco con respecto al control, c = límite inferior, d = límite superior, b = pendiente, R² aj = 1 - (sumas de cuadrados de la regresión / sumas totales de cuadrados corregidas), g = dosis de herbicida en el punto de inflexión (es decir, ED₅₀), y x = dosis de herbicida. IC son los intervalos de confianza del 95% (n = 10). FR = Factor de resistencia = ED₅₀R / ED₅₀S.

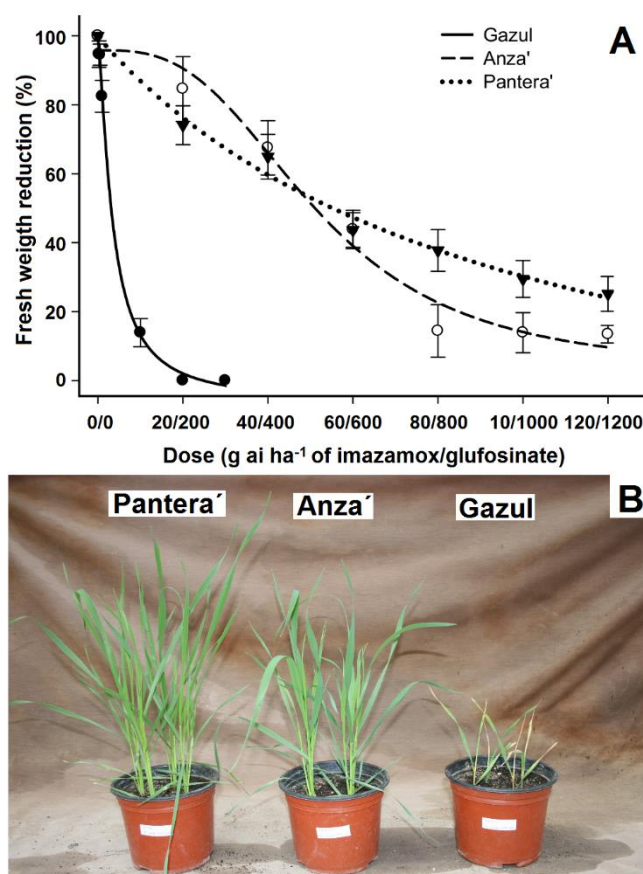


Figura 11. A) Curva de dosis-respuesta de la reducción del peso fresco respecto a las plantas de control no tratadas de diferentes líneas de trigo (*Triticum aestivum*), tratadas con mezclas de imazamox + glufosinato y evaluadas a los 21 días después del tratamiento. Barras verticales \pm error estándar ($n = 10$). B) Plantas de trigo tratadas con 40 + 750 g ai ha⁻¹ de imazamox y + glufosinato, respectivamente.

4.2. Estudios de retención foliar

Las cantidades medias de solución de imazamox retenidas en las hojas de las diferentes plantas de trigo fueron 103 ± 2.1 , 92 ± 7.9 , 96 ± 4.5 y 90 ± 8.1 $\mu\text{L g}^{-1}$ de peso seco en Gazul, Rafalín, Simeto y Antoñín, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos.

En cuanto a la retención foliar de la solución de herbicida (IMA + GLU), se encontraron diferencias entre las líneas de trigo, siendo el promedio de solución de herbicida retenida 260 ± 42 (a), 240 ± 32 (a) y 190 ± 27 (b) $\mu\text{L g}^{-1}$ de peso seco para Pantera, Anza y Gazul, respectivamente, lo que muestra que las líneas R retuvieron más solución de herbicida.

4.3. Estudios de absorción-translocación ^{14}C -imazamox y ^{14}C -glufosinato

Los cultivares de trigo Gazul (S), Rafalín (R), Simeto (S) y Antoñín (R) presentaron una alta tasa de absorción de ^{14}C -imazamox. A las 12 h después del tratamiento (HDT), los cultivares S presentaron un nivel de absorción de más del 87%, absorbiendo hasta más del 94% a las 96 HDT, mientras que los cultivares R exhibieron una absorción promedio de 73% y 88% a las 12 y 96 HDT, respectivamente. Aunque los cultivares S absorbieron más ^{14}C -imazamox, las diferencias no fueron significativas con respecto a los cultivares R (Figura 12).

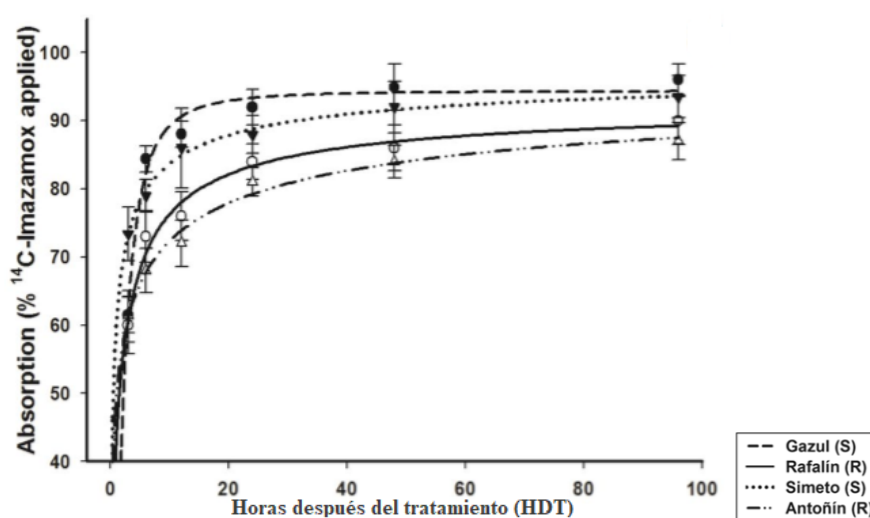


Figura 12. Absorción de ^{14}C -imazamox en variedades de trigo blando (*Triticum aestivum*) y duro (*Triticum durum*) susceptibles y resistentes a imazamox. Barras verticales \pm error estándar (n = 5).

Los cultivares S mostraron altas tasas de translocación de ^{14}C -imazamox desde las hojas tratadas hasta el resto de la planta y las raíces. Las mayores diferencias en la translocación se observaron a las 96 HDT. Las tasas de translocación a las raíces de los cultivares R fueron 16.1% y 16.6% para Rafalín y Antoñín, respectivamente, para el herbicida absorbido. Translocando 8.5-10.3% menos de herbicida a las raíces que los cultivares S y reteniendo aproximadamente 60% en las hojas tratadas de ambos cultivares resistentes a imazamox. Para este tiempo, los cultivares S presentaron una mayor translocación de ^{14}C -imazamox de las hojas tratadas al resto de la planta y raíces (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de translocación de ^{14}C -imazamox en variedades de trigo duro (*Triticum durum*) y blando (*Triticum aestivum*) susceptibles y resistentes a imazamox.

Cultivar	HDT	Translocación de imazamox (% del absorbido)		
		Hoja tratada	Resto de planta	Raíz
Variedades de trigo blando				
Gazul (S)	3	95.1 ± 1.1 a	2.2 ± 0.7 h	2.6 ± 1.3 g
	6	88.8 ± 2.8 b	3.3 ± 2.5 h	7.9 ± 0.8 f
	12	73.3 ± 2.5 d	12.8 ± 2.3 f	13.9 ± 0.9 e
	24	65.6 ± 1.5 ef	14.5 ± 1.9 e	19.9 ± 1.8 c
	48	54.3 ± 3.9 g	22.9 ± 3.0 b	22.8 ± 2.1 b
	96	45.4 ± 2.5 h	30.0 ± 1.7 a	24.6 ± 1.8 a
Rafalín (R)	3	94.2 ± 1.5 a	3.3 ± 0.4 h	2.6 ± 1.1 g
	6	88.8 ± 3.3 b	2.9 ± 2.3 h	8.3 ± 1.2 f
	12	79.7 ± 3.3 c	6.9 ± 1.1 g	13.3 ± 2.6 e
	24	70.2 ± 2.4 de	16.1 ± 1.3 d	13.8 ± 1.9 e
	48	67.3 ± 4.1 e	18.6 ± 2.8 c	14.2 ± 3.0 e
	96	61.9 ± 3.6 f	22.1 ± 1.4 b	16.1 ± 2.0 d
Variedades de trigo duro				
Simeto (S)	3	92.4 ± 1.0 A	3.6 ± 0.6 H	4.0 ± 0.5 H
	6	84.8 ± 2.9 B	9.6 ± 3.1 G	5.6 ± 0.5 G
	12	77.1 ± 1.5 C	9.0 ± 1.3 G	13.9 ± 0.3 D
	24	51.7 ± 0.7 G	20.9 ± 1.9 D	27.3 ± 2.4 A
	48	42.6 ± 1.2 H	31.8 ± 2.1 B	25.6 ± 2.2 B
	96	38.0 ± 4.6 I	35.1 ± 1.7 A	26.9 ± 3.0 AB
Antoñín (R)	3	94.5 ± 1.7 A	2.2 ± 0.1 H	3.3 ± 1.6 H
	6	83.4 ± 1.5 B	8.3 ± 0.7 G	8.3 ± 1.2 F
	12	73.3 ± 3.1 C	15.5 ± 4.7 F	11.2 ± 1.6 E
	24	69.1 ± 3.1 D	18.5 ± 1.4 E	12.4 ± 2.1 DE
	48	63.9 ± 3.0 E	22.3 ± 2.4 D	13.9 ± 2.8 D
	96	59.2 ± 1.4 F	19.2 ± 1.7 C	16.6 ± 2.1 C

HDT: horas después del tratamiento. Las medias con diferentes letras dentro de una columna son estadísticamente diferentes con una probabilidad del 95% determinada por la prueba de Tukey. \pm error estándar de la media (n = 5).

Para confirmar los resultados anteriores Se utilizó un generador de imágenes de fósforo. A las 96 HDT, las plantas R translocaron cantidades más pequeñas de ^{14}C -imazamox de la hoja tratada a las raíces que las plantas S. Este hallazgo muestra que la translocación ^{14}C -imazamox podría haber contribuido a la resistencia de los cultivares R (Figura 13).

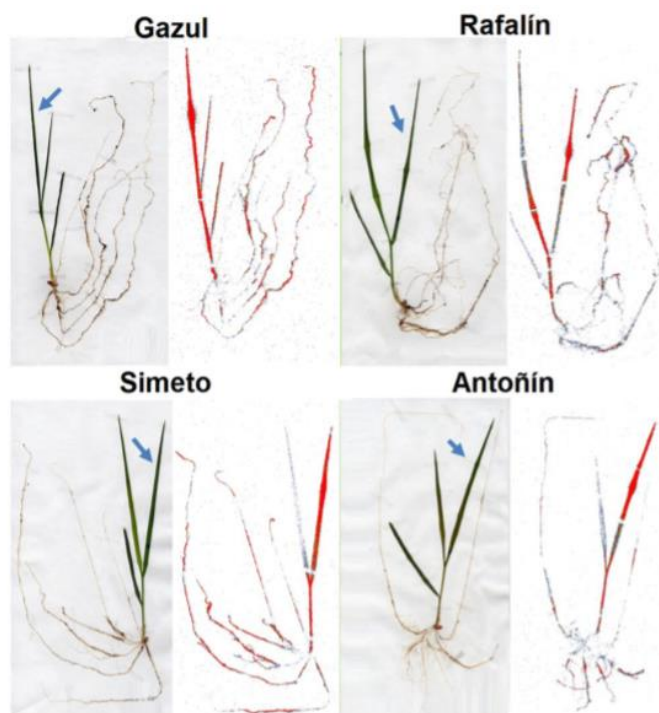


Figura 13. Visualización de ^{14}C -imazamox en plantas de trigo susceptibles y resistentes a imazamox a las 96 HDT. La mayor concentración de ^{14}C -imazamox se resalta en rojo. Las flechas indican la hoja tratada.

Para los cultivares Anza y Pantera se observaron tasas de absorción foliar de ^{14}C -imazamox mayores al 50% desde las 3 HDT. Existiendo diferencias en las líneas de trigo entre las 3 y las 12 HDT. En este período, las dos líneas R absorbieron una mayor cantidad de herbicida que el cultivar S (Gazul). Sin embargo, no existieron diferencias de absorción entre líneas de trigo desde las 24 HDT, mostrando tasas de absorción de ^{14}C -imazamox superiores al 90% en todos los casos (Figura 14).

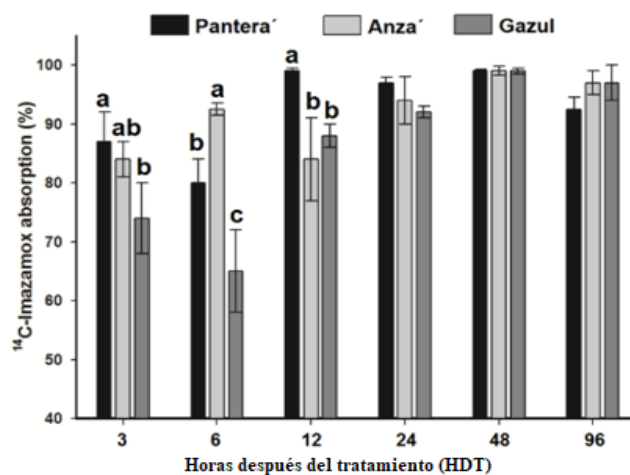


Figura 14. Absorción de ^{14}C -imazamox en plantas susceptibles y resistentes de trigo (*Triticum aestivum*) desde las 3 a las 96 h después del tratamiento (HDT). Barras verticales \pm error estándar ($n = 5$).

Estos cultivares de trigo (Anza y Pantera) mostraron altas tasas de translocación de ^{14}C -imazamox desde la hoja tratada al resto de la planta y las raíces. En el primer periodo (3 a 12 HDT), el ^{14}C -imazamox se retuvo principalmente en la hoja tratada, pero a partir de las 24 HDT, se observaron altas tasas de translocación al resto de la planta y las raíces (Figura 15). A las 96 HDT, la cantidad de ^{14}C -imazamox cuantificada en cada sección de la planta, fue similar entre las líneas de trigo que oscilaban entre 30 y 40% (Figura 16).

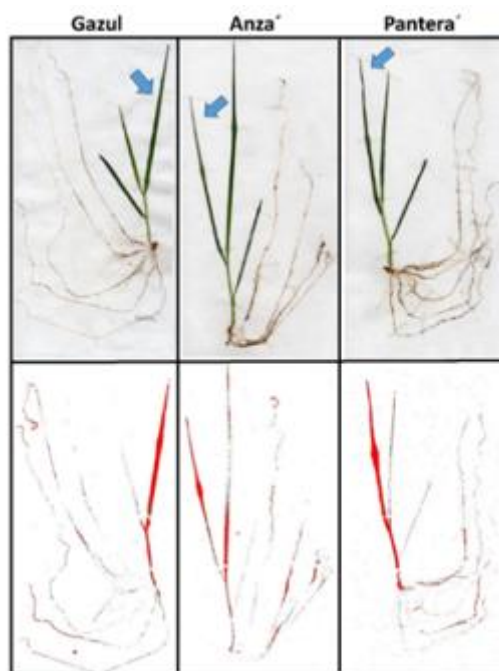


Figura 15. Visualización de ^{14}C -imazamox a las 96 HDT. La mayor concentración de ^{14}C -imazamox se resalta en rojo. Las flechas indican la hoja tratada.

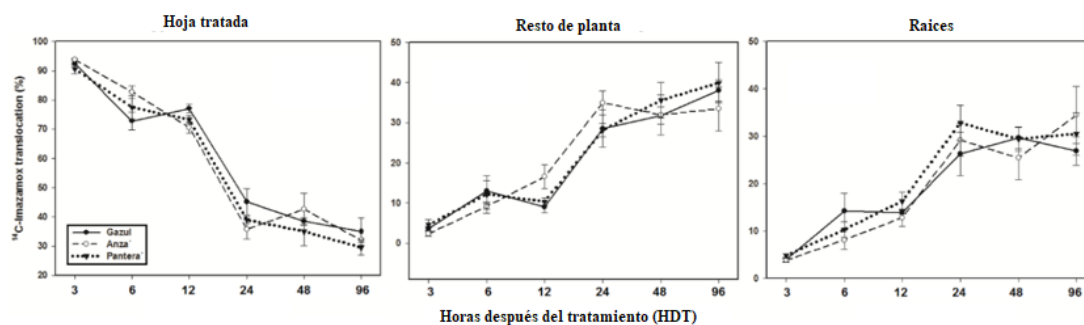


Figura 16. Translocación de ^{14}C -imazamox de la hoja tratada al resto de la planta y raíces desde las 3 a las 96 HDT. Las barras verticales representan \pm errores estándar (n = 5).

Las tasas de absorción foliar de ^{14}C -glufosinato fueron inferiores al 40%. Se observaron diferencias en las tasas de translocación excepto a las 12 HDT. En general, las dos líneas R absorbieron una mayor cantidad de herbicida que el cultivar S (Figura 17).

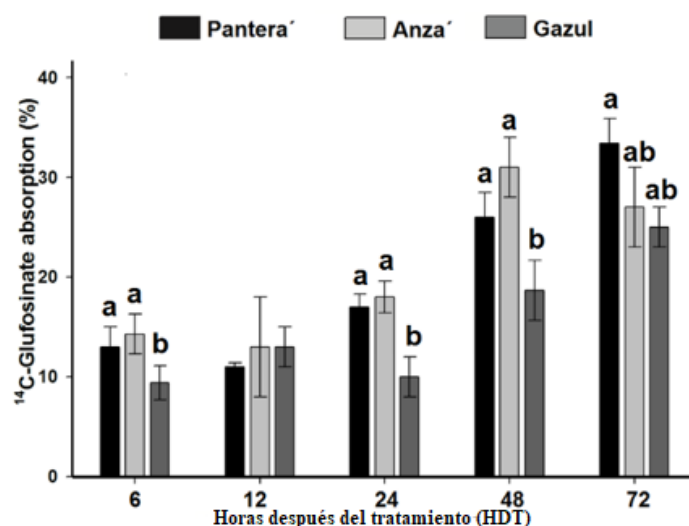


Figura 17. Absorción de ^{14}C -glufosinato desde las 3 a las 96 HDT. Las barras verticales representan \pm error estándar (n = 5).

Los cultivares de trigo R (Anza y Pantera) y S (Gazul) mostraron bajas tasas de translocación de ^{14}C -glufosinato, sin diferencias significativas entre ellas. La mayor parte del herbicida (> 75%) se retuvo principalmente en la hoja tratada (Figura 18). Las cantidades de ^{14}C -glufosinato que se translocaron al resto de la planta y las raíces fueron inferiores a 18 y 14%, respectivamente (Figura 19).



Figura 18. Visualización de ^{14}C -glufosinato a las 96 HDT. La mayor concentración de ^{14}C -glufosinato se resalta en rojo. Las flechas indican la hoja tratada.

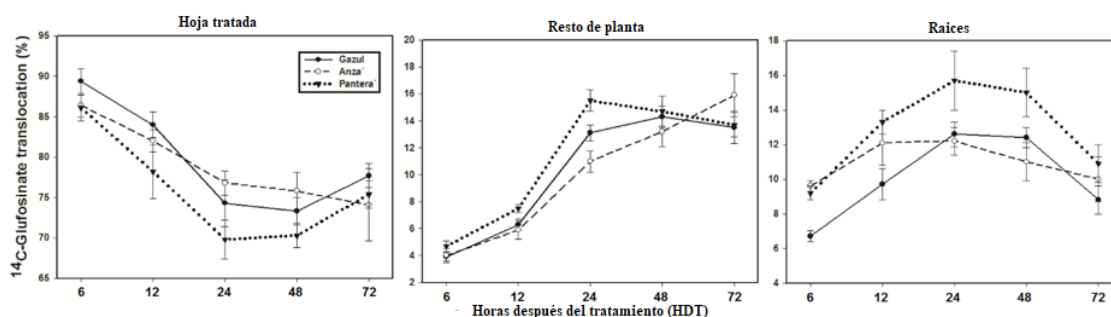


Figura 19. Translocación de ^{14}C -glufosinato de la hoja tratada al resto de la planta y raíces desde las 3 a las 96 HDT. Las barras verticales representan \pm errores estándar ($n = 5$).

4.4. Estudio de metabolismo de imazamox

Las plantas R (Rafalín y Antoñín) presentaron un metabolismo rápido de imazamox a imazamox hidroxilado (imazamox-OH) y a un conjugado de glucosa (imazamox-glucosa), metabolitos no encontrados en los cultivares S (Gazul y Simeto). Teniendo en cuenta que estos metabolitos provienen de imazamox, consideramos que la suma de todos ellos es del 100%, y por tanto, se puede calcular el porcentaje de imazamox metabolizado

en hojas y raíces. Los cultivares R poseen un alto contenido de metabolitos a las 96 HDT en comparación con los cultivares S. En el caso de los cultivares de Rafalín y Antoñín, más del 90% correspondió a metabolitos de imazamox, mientras que los cultivares Gazul y Simeto no metabolizaron este herbicida. Cabe destacar que el cultivar Antoñín presentó mayores contenidos del metabolito glucosilado ($84.1 \mu\text{g g}^{-1}$ en hojas y $47.6 \mu\text{g g}^{-1}$ en raíces) en comparación con el cultivar Rafalín ($50.4 \mu\text{g g}^{-1}$ en hojas y $29.1 \mu\text{g g}^{-1}$ en raíces). La inhibición del metabolismo de Imazamox también se observó en plantas R tratadas con malatión. Este hallazgo sugiere que la monooxigenasa del citocromo P₄₅₀ (Cit-P₄₅₀) está involucrada en este mecanismo de desintoxicación (Figura 20).

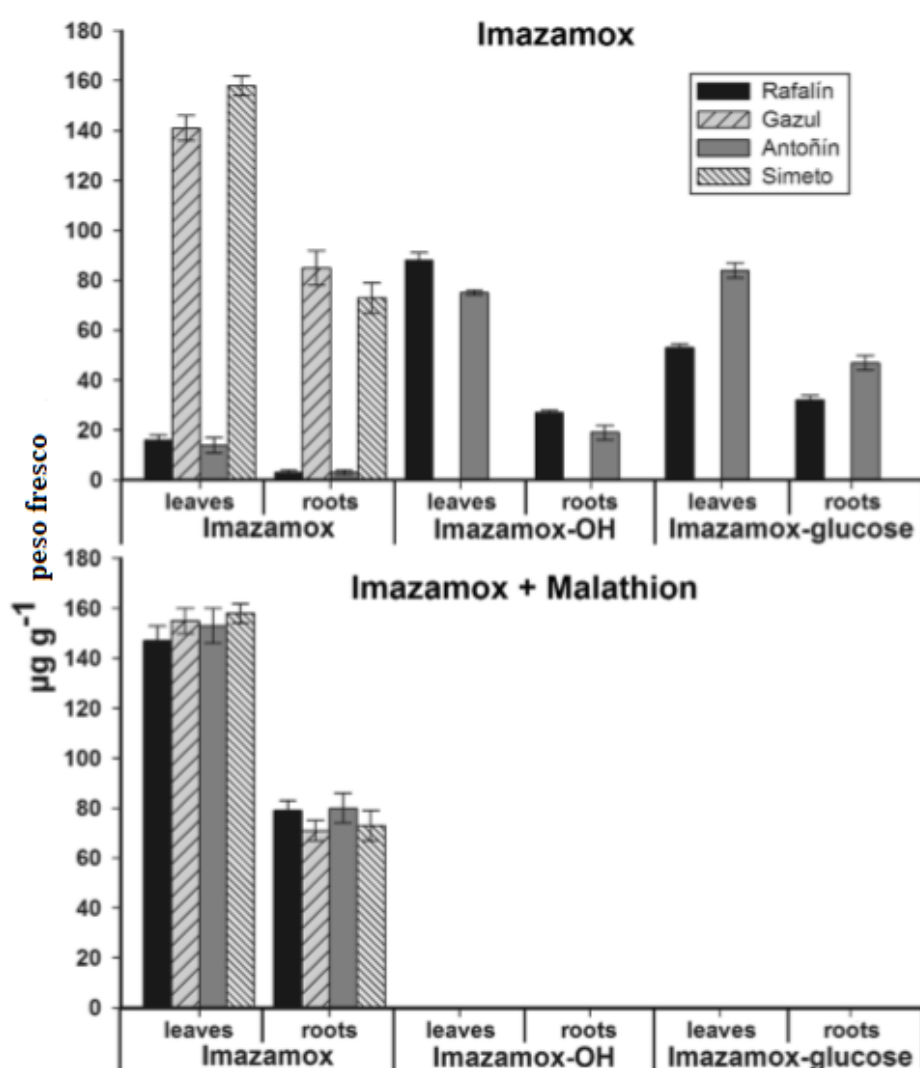


Figura 20. Metabolismo de Imazamox en variedades de trigo blando (*Triticum aestivum*) y duro (*Triticum durum*) tratadas a dosis de campo (40 g ai ha^{-1} imazamox) a las 96 HDT. Las barras indican la desviación estándar de la media ($n = 3$).

4.5. Acumulación de amonio

Los cultivares de trigo R (Anza y Pantera) y S acumularon amoníaco en diferentes niveles. De 0 a 100 μM de glufosinato, la acumulación de amoníaco fue similar entre ellos. Sin embargo, Gazul, la línea de trigo S, mostró la mayor acumulación de amonio (365 ± 88 μg de amoníaco por gramo de peso fresco) a 300 μM de glufosinato. A esta concentración de glufosinato, Pantera y Anza acumularon al menos un 60% menos de amoníaco que Gazul (Figura 21).

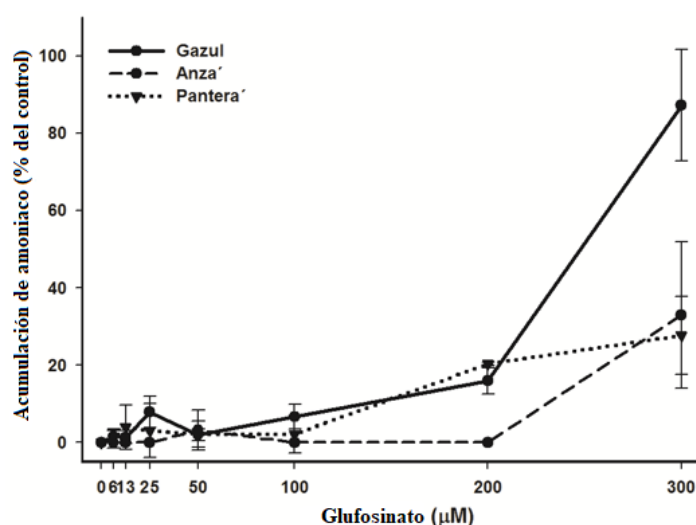


Figura 21. Acumulación de amoníaco (%) a diferentes concentraciones de glufosinato (μM) en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) susceptibles y resistentes. Barras verticales \pm error estándar ($n = 3$).

4.6. Estudio de la actividad enzimática ALS

Las actividades *in vitro* de la enzima ALS en Gazul, Rafalín, Simeto y Antoñín fueron de 287, 276, 302 y 293 nmol de acetoína mg^{-1} proteína h^{-1} , respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ellas. El imazamox inhibió la actividad de ALS en todos los cultivares a medida que las concentraciones aumentaban. Para inhibir la actividad de ALS en un 50% (I_{50}), se requirieron 3,8 y 5,3 μM de imazamox para Gazul y Simeto (cultivares S), respectivamente. Los cultivares R (Antoñín y Rafalín) presentaron FRs que fueron 13.8 y 82.7 veces mayores, respectivamente, en relación con su correspondiente cultivar S. Los cultivares R mostraron resistencia múltiple a los herbicidas de la familia IMI; sin embargo, no eran resistentes a las otras familias de herbicidas inhibidores de ALS (Figura 22, Tabla 9).

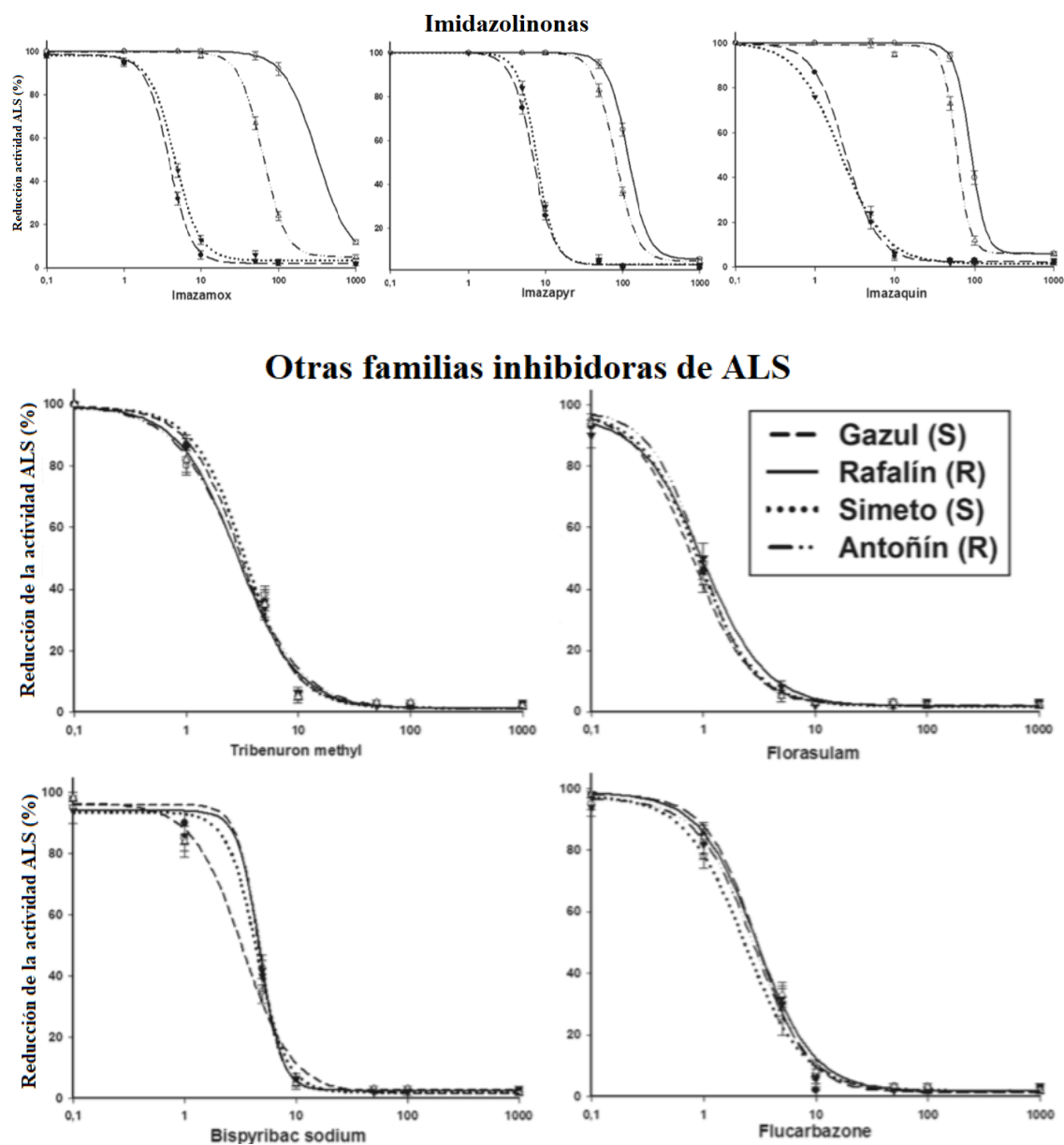


Figura 22. Curvas de reducción de actividad ALS (%) de cinco familias inhibidoras de ALS en plantas susceptibles y resistentes a imazamox de las variedades de trigo blando (*Triticum aestivum*) y duro (*Triticum durum*). Barras verticales \pm error estándar ($n = 3$).

Tabla 9. Parámetros de la ecuación sigmoideal utilizada para estimar la concentración (μM) de herbicidas inhibidores de ALS necesarios para inhibir la actividad acetolactato sintasa en un 50% (I_{50}) en variedades de trigo blando (*Triticum aestivum*) y duro (*Triticum durum*) susceptibles y resistentes a imazamox.

Herbicida	Cultivar	c	d	b	R^2_{aj}	P	$I_{50}(CI95)$	FR
Imidazolinonas								
Imazamox	Rafalín	100.0	4.2	2.1	1.00	<0.0001	314.1 (23.7)	82.7
	Gazul	98.3	2.0	2.9	0.99	<0.0001	3.8 (0.93)	---
	Antoñín	99.7	4.9	2.9	0.99	<0.0001	62.3 (8.2)	13.8
	Simeto	98.3	3.4	2.6	0.99	<0.0001	4.5 (0.87)	---
Imazapyr	Rafalín	100.0	5.4	3.4	0.99	<0.0001	176.6 (14.5)	25.6
	Gazul	100.0	3.2	3.2	0.99	<0.0001	6.9 (0.64)	---
	Antoñín	100.0	4.9	3.1	0.99	<0.0001	80.7 (6.2)	10.6
	Simeto	100.0	3.6	3.7	0.99	<0.0001	7.6 (0.81)	---
Imazaquin	Rafalín	100.0	5.9	4.6	1.00	<0.0001	88.6 (5.7)	36.9
	Gazul	99.9	2.3	2.1	0.99	0.0002	2.4 (0.23)	---
	Antoñín	99.0	5.9	5.2	0.99	<0.0001	59.9 (4.3)	28.5
	Simeto	100.2	1.5	1.6	0.99	<0.0001	2.1 (0.16)	---
Otras familias de inhibidores de la ALS								
Tribenuron metil (SU)	Rafalín	99.4	0.9	1.5	0.98	<0.0001	2.4 (0.11)	0.8
	Gazul	100.0	1.8	1.1	0.96	0.0066	2.9 (0.22)	---
	Antoñín	99.7	0.8	1.3	0.99	<0.0001	2.7 (0.31)	0.9
	Simeto	100.0	1.1	1.1	0.98	<0.0001	2.8 (0.14)	---
Florasulam (TP)	Rafalín	100.0	2.0	1.1	0.96	<0.0001	1.3 (0.23)	1.4
	Gazul	96.5	1.7	1.6	0.99	<0.0001	0.9 (0.14)	---
	Antoñín	100.0	2.1	1.3	0.98	0.0005	1.2 (0.17)	1.5
	Simeto	99.7	2.3	1.1	0.99	<0.0001	0.8 (0.11)	---
Bispyribac sodium (PTB)	Rafalín	96.0	2.5	4.5	0.99	<0.0001	4.7 (0.62)	1.1
	Gazul	93.6	1.9	3.3	0.98	0.0011	4.4 (0.41)	---
	Antoñín	94.0	2.4	4.4	0.98	0.0176	4.7 (0.62)	1.4
	Simeto	96.4	1.4	1.9	0.98	0.0072	3.3 (0.75)	---
Flucarbazone (SCT)	Rafalín	97.6	1.8	1.6	0.99	0.0004	2.3 (0.20)	0.8
	Gazul	98.1	1.1	1.9	0.98	0.0028	3.0 (0.45)	---
	Antoñín	96.7	1.3	1.7	0.99	0.0010	2.8 (0.32)	0.9
	Simeto	98.6	1.6	1.7	0.99	0.0004	2.9 (0.27)	---

c = límite inferior, d = límite superior, b = pendiente, $R^2_{aj} = 1 - (\text{sumas de cuadrados de la regresión} / \text{sumas totales de cuadrados corregidas})$. RF = Factor de resistencia = I_{50R} / I_{50S} . Los valores de CI son los intervalos de confianza del 95% ($n = 3$). SU = sulfonilureas. PTB = pirimidiniltiobenzoatos. SCT = sulfonilaminocarboniltiazolinona. TP = triazolopirimidinas.

De acuerdo con los intervalos de confianza (IC) del 95%, los cultivares S no mostraron diferencias significativas en los parámetros I_{50} . Independientemente de la variedad de trigo, el cultivar Rafalín es el que soporta una mayor dosis de imazamox.

Igualmente, las actividades *in vitro* de la enzima ALS para Anza y Pantera fueron 279 ± 23 , 294 ± 42 nmol de acetoína mg^{-1} proteína h^{-1} , respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ellas. De manera similar a lo ocurrido para los cultivares anteriores, imazamox inhibió la actividad de ALS en todos los casos a medida que aumentaban las concentraciones (Figura 23). Los FRs de Anza y Pantera fueron de 16.4 y 24.7, respectivamente, en comparación con Gazul (Tabla 10).

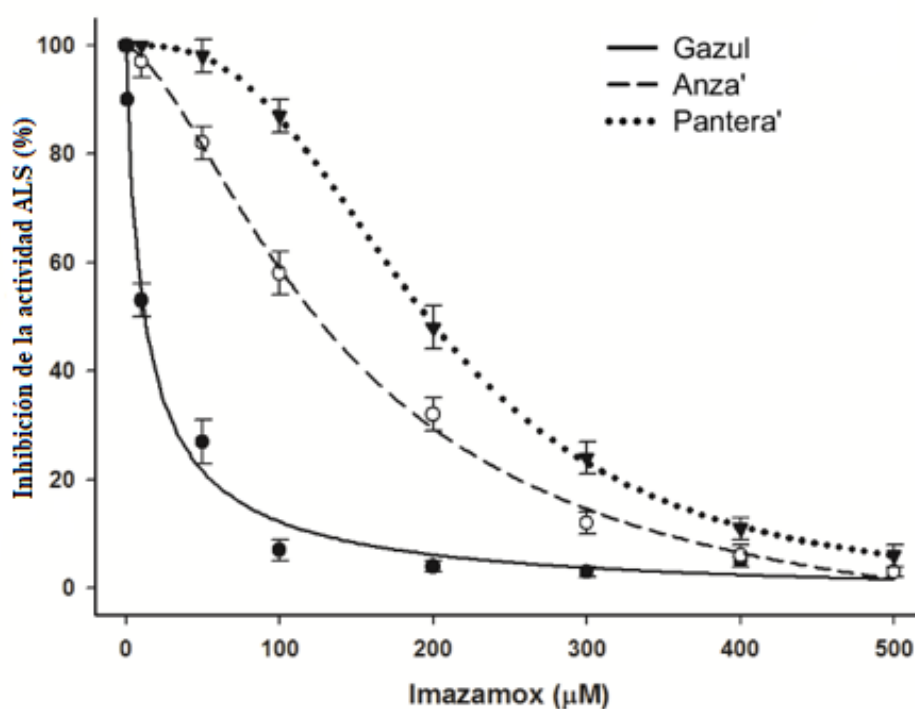


Figura 23. Curvas de actividades enzimáticas ALS en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) susceptibles y resistentes. Barras verticales \pm error estándar ($n = 3$).

Tabla 10. Parámetros de la ecuación sigmoideal utilizados para estimar la concentración (μM) de imazamox necesario para inhibir la actividad enzimática de ALS en un 50% (I_{50}), en plantas sensibles y resistentes de trigo blando (*Triticum aestivum*).

Imazamox						
Cultivar	c	d	b	R^2_{aj}	$I_{50}(\text{CI}95\%)$	FR
Gazul	-2.3	99.9	0.86	0.99	8.7 (3.6)	
Anza	-1.2	99.6	1.56	0.99	142.3 (17.4)	16.4
Pantera	-1.2	100.1	2.75	0.99	214.6 (23.5)	24.7

$Y = c + \{(d-c) / [1 + (x / g)^b]\}$ donde; Y = porcentaje de actividad enzimática con respecto al control, c = límite inferior, d = límite superior, b = pendiente, $R^2_{aj} = 1 - (\text{sumas de cuadrados de la regresión} / \text{sumas totales de cuadrados corregidas})$, g = concentración de herbicida en el punto de inflexión (es decir, I_{50}), y x = concentración de herbicida. CI son los intervalos de confianza del 95% ($n = 3$). FR = Factor de resistencia = $\text{GR}_{50R} / \text{GR}_{50S}$.

4.7. Estudio de la actividad enzimática GS

Las actividades *in vitro* de la enzima GS para Anza, Pantera y Gazul fueron 390 ± 46 , 443 ± 33 y 421 ± 62 nmol de glutamina mg^{-1} proteína h^{-1} , respectivamente, sin diferencias significativas entre ellas. El glufosinato inhibió la actividad de GS en todos los cultivares a medida que las concentraciones aumentaban (Figura 24). La cantidad de glufosinato para inhibir la actividad GS en un 50% (I_{50}) osciló desde 15.7 a 21.1 μM . De acuerdo con los intervalos de confianza (IC) del 95%, no hubo diferencias significativas entre las líneas de trigo R y S (Tabla 11).

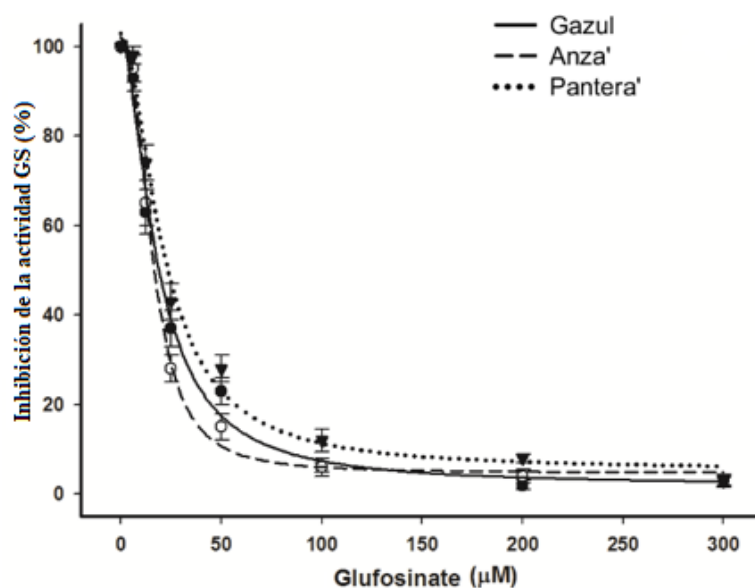


Figura 24. Curvas de actividades enzimáticas GS en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) susceptibles y resistentes. Barras verticales \pm error estándar ($n = 3$).

Tabla 11. Parámetros de la ecuación sigmoideal utilizados para estimar la concentración (μM) glufosinato necesario para inhibir la actividad enzimática GS en un 50% (I_{50}), en plantas sensibles y resistentes de trigo blando (*Triticum aestivum*).

Glufosinato						
Cultivar	c	d	b	R^2_{aj}	$I_{50}(\text{CI}95\%)$	FR
Gazul	1.9	102.2	1.66	0.98	18.0 (4.7)	
Anza	4.8	101.7	2.37	0.99	15.7 (5.1)	0.9
Pantera	1.7	103.0	1.75	0.98	21.1 (7.2)	1.2

$Y = c + \{(d-c) / [1 + (x / g)^b]\}$ donde; Y = porcentaje de actividad enzimática con respecto al control, c = límite inferior, d = límite superior, b = pendiente, $R^2_{aj} = 1 - (\text{sumas de cuadrados de la regresión} / \text{sumas totales de cuadrados corregidas})$, g = concentración de herbicida en el punto de inflexión (es decir, I_{50}), y x = concentración de herbicida. CI son los intervalos de confianza del 95% ($n = 3$). FR = Factor de resistencia = $\text{GR}_{50}\text{R} / \text{GR}_{50}\text{S}$.

4.8. Secuenciación de la ALS

El cultivar R Rafalín presentó dos mutaciones en la posición Ser653 en los genes *imi1* e *imi2*, mientras que el cultivar Antoñín presentó la misma mutación, pero sólo en el gen *imi2*. El cambio de codón fue de AAC a AGC, dando como resultado una sustitución de aminoácidos de serina a asparagina. No se encontró ninguna mutación en el gen *imi3* (Figura 25).

	650	660
	---	---
<i>Imi1</i>	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMIMEGD
AY210407	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMIMEGD
Gazul (S)	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMIMEGD
Rafalín (R)	PHQEHVLPMI	NSGGAFKDMIMEGD
Simeto (S)	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMIMEGD
Antoñín (R)	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMIMEGD
<i>Imi2</i>	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMIMEGD
AY210408	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMIMEGD
Gazul (S)	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMIMEGD
Rafalín (R)	PHQEHVLPMI	NSGGAFKDMIMEGD
Simeto (S)	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMIMEGD
Antoñín (R)	PHQEHVLPMI	NSGGAFKDMIMEGD

Figura 25. Alineamiento parcial de las secuencias de aminoácidos para los genes *imi1*-ALS e *imi2*-ALS de los cultivares susceptible y resistentes a imazamox de las diferentes variedades de trigo blando (*Triticum aestivum*) y duro (*Triticum durum*). Las letras de colores indican la posición Ser-653 correspondiente a la mutación puntual asociada con la obtención de la resistencia al imazamox. Las letras rojas indican un cambio en la posición 653 de AAC (serina = S) a AGC (asparagina = N) en la secuencia de consenso de nucleótidos.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El control de malas hierbas en trigo es uno de los principales objetivos de los agricultores para obtener mayores rendimientos, este manejo sin el uso de herbicidas es inconcebible en los sistemas convencionales de producción intensiva de trigo (Jabran et al., 2017). Por ello, el trigo Clearfield® resistente a imazamox es una herramienta nueva y altamente efectiva que ofrece ventajas significativas para el control de malezas, este cultivo se ha desarrollado en América del Norte y en la mayoría de los países de América Latina.

Este estudio informa sobre el primer caso europeo de dos cultivares de trigo resistentes a imazamox, basados en la tecnología Clearfield®, que se obtuvieron mediante el cruzamiento de Pantera *T. aestivum* Clearfield® (Jiménez et al., 2016) y un cultivar local susceptible a imazamox (Gazul) y otro *Triticum durum* Clearfield® obtenido por el cruce de Simeto (cultivar local de *T. durum* susceptible a imazamox) y *Tritordeum* Clearfield® (Rodríguez-Suarez et al., 2009). Además, se han caracterizado dos nuevas líneas de *T. aestivum* R (Anza y Pantera), que poseen características que confieren resistencia múltiple a imazamox y glufosinato.

Los ensayos de dosis-respuesta demostraron la alta susceptibilidad de los cultivares S (Gazul y Simeto) a dosis bajas, mientras que los cultivares R (Rafalín y Antoñín) presentaron una pequeña reducción en el peso fresco. Sin embargo, para lograr la reducción total del crecimiento en una planta de estos cultivares, se debe aplicar al menos el doble de la tasa de herbicida correspondiente a su ED₅₀ (Alcántara-de la Cruz et al., 2016a). Por lo que los cultivares de Antoñín y Rafalín requieren dosis de imazamox que son 8 y 11 veces, respectivamente, superiores a la dosis de campo recomendada de 40 g ia ha⁻¹ de imazamox para producir un daño total en el cultivo. Por otro lado, las líneas Anza y Pantera presentaban niveles aceptables de resistencia múltiple a imazamox y glufosinato, mostrando valores de ED₅₀ para Anza dentro del rango de dosis de 20 a 60 y de 450 a 750 g ai ha⁻¹ para imazamox y glufosinato respectivamente, según los fabricantes (BASF, 2017a, Bayer CropScience, 2017)., y los valores de ED₅₀ para Pantera fueron superiores a ellos. Además, hasta ahora no se conocen efectos antagónicos entre estos herbicidas (Cedengreen, 2014), y aquí se observó un efecto de aditividad en los síntomas sufridos por la variedad S Gazul. Las diferencias entre los cultivares R podrían explicarse por los diferentes rasgos bioquímicos, morfológicos, fisiológicos y moleculares (Menéndez et al., 2014; Rojano-Delgado et al., 2014a y Yao et al., 2014). Este alto nivel

de resistencia al imazamox de los cultivares R de trigo es suficiente para ser una herramienta útil de control de malezas, con ventajas para los agricultores. El uso adecuado de cultivos tolerantes a los herbicidas y la adopción de prácticas agronómicas adecuadas pueden mejorar la biodiversidad de las tierras de cultivo y mitigar el riesgo de malezas que evolucionan con resistencia a los herbicidas (Lamichhane et al., 2017).

La efectividad de un herbicida depende de la retención del producto en la hoja (Yao et al., 2014), la absorción foliar del ingrediente activo y finalmente su translocación al sitio de acción (Menéndez et al., 2014 y Rojano-Delgado et al., 2014a). La retención foliar de herbicidas está influenciada por las características morfológicas y fisiológicas de las hojas. Asimismo, la disposición de los tricomas y la cantidad de ceras cuticulares también contribuyen a una mayor o menor retención foliar de la solución de herbicida (Alcántara-de la Cruz et al., 2016b), aunque no es un mecanismo importante que confiere resistencia a los herbicidas (Yao et al., 2014 y Alcántara-de la Cruz et al., 2016c). Nuestros resultados sugieren que la morfología de la hoja de los cultivares de trigo no está relacionada con una mayor o menor retención de herbicidas, como se demostró en otros cultivares de trigo resistentes a imazamox (Rojano-Delgado et al., 2015; Jiménez et al., 2015 y 2016). De hecho, las líneas de trigo R Anza y Pantera retuvieron una mayor solución de herbicida que Gazul, posiblemente debido al mayor área foliar de estas variedades, como se puede apreciar visualmente en la Figura 11b. Estos parámetros no se estudiaron en estas líneas de trigo porque las plantas R presentaron una mayor retención foliar, por lo que se puede deducir, al igual que para los cultivares anteriores, que este parámetro no desempeñó un papel importante en la resistencia múltiple a imazamox y glufosinato.

El imazamox se absorbe y se transloca muy rápidamente. Sin embargo, dado que la resistencia a los herbicidas inhibidores de ALS generalmente se asocia con mutaciones en el gen ALS (Rojano-Delgado et al., 2015; Yu y Powles, 2014 y Yuan et al., 2007), la absorción y la translocación no suelen estudiarse, y la información sobre estos mecanismos en los cultivos de Clearfield® es escasa. En nuestro estudio se registraron altas tasas de absorción para todos los cultivares S y R, confirmando que este mecanismo no está involucrado en la resistencia de este último. Por el contrario, los resultados de la translocación ^{14}C -imazamox difieren entre cultivares. Para el caso de las líneas de Rafalín y Antoñín sugirieron que este parámetro podría jugar un papel importante en la resistencia debido a que retuvieron la mayor parte del herbicida en la hoja tratada. Sin embargo, estas diferencias en translocación no fueron sólo una respuesta fisiológica, sino también

metabólica, la cual fue observada entre los cultivares R y S en ausencia de malatía e inexistente en presencia del mismo. La translocación más baja observada en los cultivares R puede explicarse por el hecho de que estos cultivares metabolizaron imazamox a sus metabolitos (imazamox-OH e imazamox-glucosa) que tienen una movilidad limitada (Pester et al., 2001). Por lo tanto, las observaciones realizadas durante los ensayos de absorción y translocación en los cultivares R de trigo mostraron el ^{14}C -imazamox translocado sino también estos ^{14}C -metabolitos. Sin embargo, las líneas de trigo R (Anza y Pantera) y S presentaron patrones de translocación de ^{14}C -imazamox similar entre ellas durante el período de evaluación (de 3 a 96 HDT). Esto sugirió que estos mecanismos no estaban implicados en la resistencia a imazamox de estas líneas de trigo R. La absorción y la translocación reducidas pueden jugar un papel importante en la resistencia a otros herbicidas como el glifosato (Shaner, 2009), pero en la resistencia a los herbicidas inhibidores de la ALS este papel es secundario (Yu y Powles, 2014). Igualmente se observaron altas velocidades de absorción y translocación en *Aegilops cylindrica* resistente a imazamox, centeno silvestre (Pester et al., 2001), frijol seco y lenteja roja (Bukun et al., 2012).

Los patrones de absorción y translocación de ^{14}C -glufosinato fueron menores que para el caso de imazamox. Esto fue debido a la movilidad limitada de este herbicida por su rápida fitotoxicidad en el tejido foliar de la aplicación (Jalaludin et al., 2017). Lo que se demuestra por las bajas cantidades de glufosinato absorbido y translocado desde la hoja tratada al resto de la planta y las raíces en las plantas de trigo R y S (menos del 40 y 20% respectivamente). Las diferencias de estos parámetros pueden estar relacionada con la sensibilidad de las plantas a glufosinato (Pronprom et al., 2009; Everman et al., 2009). La absorción de ^{14}C -glufosinato fue ligeramente mayor en plantas de trigo R, siendo la translocación similar entre las plantas S y R a las 72 HDT. La absorción de glufosinato varía dependiendo de la especie, observándose menos del 20% en plantas resistentes como el maíz (Everman et al., 2009) y más del 90% en malezas de difícil control como *Lolium rigidum* y *Avena sterilis* (Kumaralake et al. 2002). La translocación limitada de ^{14}C -glufosinato puede ser una consecuencia de los efectos combinados en la acumulación de amonio y el agotamiento de la glutamina (Beriault et al., 1999). Por lo tanto, estos resultados sugirieron que la absorción y la translocación no estaban implicadas en la resistencia al glufosinato de las líneas de trigo R.

Los cultivos Clearfield® generalmente tienen la capacidad de metabolizar imazamox antes de que el herbicida llegue al sitio objetivo (BASF, 2013). En este trabajo, se estudió el metabolismo de Imazamox para el cultivar Clearfield® Pantera (Jiménez et al., 2016), y aunque no hay estudios en *Tritordeum*, es evidente que los cultivares R (Rafalín y Antoñín) adquirieron la capacidad de metabolizar los herbicidas IMI de sus equivalentes R. El mecanismo por el cual los cultivos Clearfield® ganan tolerancia a los herbicidas IMI aún no se ha caracterizado del todo (Manabe et al., 2007). En nuestro estudio, las aplicaciones de malatión confirmaron que las enzimas Cit-P₄₅₀ juegan un papel importante en la desintoxicación de imazamox de los cultivares R en compuestos que son inocuos (imazamox-OH e imazamox-glucosa) para las plantas (Rojano-Delgado et al., 2014a). Estas enzimas son mediadores de la degradación de herbicidas que están implicados en la resistencia a múltiples de ellos (Yuan et al., 2007; Gaines et al., 2014 y Yu y Powles., 2014), ya que son responsables de la hidroxilación de un grupo metilo de la molécula de imazamox (Rojano-Delgado., 2015 y Jiménez et al., 2016), seguidos de una catálisis con glucosiltransferasa que produce un conjugado de glucosa (Yu y Powles., 2014). Esta reacción ocurre rápidamente y no es reversible (Gaines et al., 2014). Además, el metabolismo de los herbicidas IMI tiene un efecto muy pequeño en la ALS, aparte de que el herbicida también se transloca mal (BASF, 2013). Sin embargo, no se puede atribuir que el metabolismo de imazamox se debiera únicamente a la enzima Cit-P₄₅₀, ya que otras vías metabólicas secundarias pueden estar implicadas en la resistencia a herbicidas inhibidores de ALS (Duhoux y Delye., 2013). Este mecanismo no se estudió en Anza y Pantera, pero puede ser un rasgo adicional que confiere resistencia a imazamox, adquirido de Clearfield® Pantera, el progenitor resistente a imazamox (Jimenez et al., 2016).

La alta acumulación de amonio debida al glufosinato observada en Gazul (S), mostró una rápida inhibición de la actividad GS. La acumulación de amonio es la respuesta directa al grado de susceptibilidad de la enzima GS a la toxicidad del glufosinato (Avila-Garcia et al., 2012). La menor acumulación de amonio en las líneas de trigo R indica que la actividad GS no se vio afectada por el glufosinato. Esto fue debido probablemente a la acetilación rápida del glufosinato al compuesto no tóxico, N-acetil-glufosinato por la enzima PAT (Jalaludin et al. 2017), proveniente del gen *bar* de la línea de trigo resistente al glufosinato T- 590 (Rojano-Delgado et al., 2013). Estos resultados concuerdan con los observados en *Lolium perenne*, donde la inhibición de la actividad enzimática de GS entre

las plantas R y S fue similar, pero la acumulación de amonio fue mayor en las plantas R (Avila-Garcia y Mallory Smith, 2010). Además, la aplicación de glufosinato causa una baja acumulación de amoníaco en arroz resistente al glufosinato (Tsai et al 2006), *Lolium perenne* ssp. *multiflorum* (Avila-Garcia et al., 2012) y algodón (Carbonari et al., 2016), que muestran una fuerte relación entre dosis-respuesta y la acumulación de amonio. Las líneas de trigo, estudiadas en este trabajo, también mostraron una fuerte relación de estos parámetros.

La resistencia a los herbicidas IMI generalmente es el resultado de una mutación puntual en el gen ALS que causa una sustitución de aminoácidos en la enzima ALS (Yu y Powles., 2014; Thompson y Taran., 2014). La alta tasa de I_{50} de los cultivares R sugiere que el mecanismo de resistencia está relacionado con la enzima ALS en los cultivares de trigo (Rojano-Delgado et al., 2015; Pozniak y Hucl., 2004; Jiménez et al., 2016). Aunque la actividad específica ALS similar entre ellos también demuestra que la sobreexpresión del gen que codifica la ALS no está involucrada como un mecanismo de resistencia. Se describieron resultados similares en *Sinapis alba* (Cruz-Hipólito et al., 2013) y *T. aestivum* (Jiménez et al., 2015), en los que la sobreexpresión de ALS no estaba implicada como mecanismo de resistencia.

Los mayores valores de ED_{50} e I_{50} estimados para Rafalín se debieron a que este cultivar presentó una mutación en la posición Ser-653 en los genes *imi1* e *imi2*, que se localizan en los brazos largos de los cromosomas 6B y 6D, respectivamente. En consecuencia, este cultivar resistente tiene un nivel de resistencia al imazamox más alto que el cultivar Antoñín, que sólo portaba un gen de resistencia (*imi2*). Los cultivares de trigo R han adquirido satisfactoriamente estos alelos de sus respectivos progenitores resistentes, es decir, los genes *imi1* e *imi2* del cultivar Pantera (Jiménez et al., 2016) se transfirieron a Rafalín, y el *imi2* de *Tritordeum* (Rodríguez-Suarez et al., 2009) se transfirió al cultivar Antoñín. El alelo resistente *imi2*, común en los cultivos Clearfield®, proporciona suficiente nivel de resistencia a las tasas de campo recomendadas para los herbicidas IMI (Pérez-Jones et al., 2010). La resistencia conferida por los genes *imi1* e *imi2* es aditiva. Estas mutaciones confieren resistencia a los herbicidas IMI, pero no a otros inhibidores de ALS (Tan et al., 2005). El coste asociado a esta resistencia es pequeño y fácilmente detectable (Yu y Powles., 2014). Sin embargo, este hecho no se puede generalizar y el impacto de cada mutación específica del gen ALS debe ser evaluado de manera individual (Vila-Aiub et al., 2009), teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento y las

diferentes especies. Además, los efectos epistáticos de los múltiples alelos de resistencia sobre el coste de adaptación de la planta asociado por esta resistencia aún se desconocen (Yu y Powles., 2014; Goldringer et al., 1997). Por lo tanto, se necesitan más estudios para determinar su efecto y la posible pérdida del rendimiento.

La isoforma ALS del genoma D, que corresponde al gen *imi2*, presenta más actividad ALS en comparación con las isoformas de los genomas A y B (Hanson et al., 2006). Este hallazgo explica por qué la mutación *imi2* es suficiente para hacer que el cultivar Antoñín sea resistente a imazamox. Nuestros resultados son consecuentes con otros estudios que demuestran que una mutación única y/o doble en los genes *imi1* y *imi2* de la ALS confieren resistencia a herbicidas IMI en cultivares de trigo (Pozniak y Hucl., 2004; Jiménez et al., 2016; Perez-Jones et al., 2010; Anderson et al., 2004), y en otros cultivos Clearfield® como arroz (Scarabel et al., 2012), cebada (Lee et al., 2011), girasoles (Kolkman et al., 2004) y garbanzos (Li et al., 2008; Thompson y Taran., 2014). Además, una mutación que se identificó en trigo en la posición Ala122 del gen *imi2* mejoró la resistencia a los herbicidas IMI (Li et al., 2008).

Las actividades específicas de ALS y GS de las líneas de trigo Anza y Pantera en ausencia de herbicidas (imazamox y glufosinato, respectivamente) fueron similares. La expresión del gen ALS es muy estable, igual que los observados en *T. aestivum* (Jiménez et al., 2015) y en varias malezas resistentes a ALS (Cruz-Hipolito et al., 2013; Cross et al., 2015). Por otro lado, la enzima GS de las líneas de trigo S y R fue igualmente sensible al glufosinato. La sustitución de His-249-Tyr en el gen codificador GS fue responsable de conferir resistencia en células de soja resistentes al glufosinato (Pronprom et al., 2009), y se propuso que la sustitución Asp-171-Asn era responsable de la resistencia en *Lolium perenne* ssp. multiflorum (Avila-Garcia et al., 2012). Sin embargo, la susceptibilidad de GS mostró que ninguna mutación fue responsable de la resistencia al glufosinato en las líneas de trigo R.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La respuesta diferencial a imazamox entre los cultivares R (Rafalín y Antoñín) y S se debió principalmente al número de genes de resistencia que portan cada genotipo, pero también se debe atribuir al metabolismo de imazamox en compuestos no tóxicos (imazamox-OH e imazamox-glucosa), regulados por el Cit-P₄₅₀. Estos mecanismos confieren una gran resistencia a los herbicidas IMI en los cultivares R, lo que les permite sobrevivir en dosis superiores a la dosis de campo recomendada de imazamox (40 g ia ha⁻¹).

Asimismo, las líneas de trigo R (Anza y Pantera), mostraron altos niveles de resistencia a imazamox + glufosinato. Los mecanismos que gobiernan la resistencia múltiple a ambos herbicidas en estas líneas de trigo se debieron a alteraciones en el sitio diana, reveladas por los ensayos de ALS en el caso de imazamox; y una inactivación rápida de glufosinato a N-acetil-glufosinato mediado por la enzima PAT. La resistencia de estas líneas podría ser mayor cuando se exponen a estos herbicidas de forma idependiente, lo que facilita la rotación de los herbicidas.

Por lo tanto, estas líneas R son una herramienta efectiva de manejo de malezas para la producción de trigo, y también pueden contribuir a mitigar los crecientes problemas de malezas con resistencia a los herbicidas.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aichele, T., Penner, D. (2005). Adsorption, desorption and degradation of imidazolinones in soil. *Weed Technol.*, 19: 154-159.
- Alcántara-de la Cruz, R., Fernández-Moreno, P. T., Ozuna, C. V., Rojano-Delgado, M. A., Cruz-Hipolito, H. E., Domínguez-Valenzuela, J. A., Barro, F., De Prado, R. (2016a). Target and non-target site mechanisms developed by glyphosate-resistant hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) populations from Mexico. *Front. Plant Sci.*, 7: 1492, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01492>.
- Alcántara-de la Cruz, R., Barro, F., Domínguez-Valenzuela, J. A., De Prado, R. (2016b). Physiological, morphological and biochemical studies of glyphosate resistance in Mexican Cologania (*Cologania broussonetii* (Balb.) DC.). *Plant Physiol. Biochem.*, 98: 72–80.
- Alcántara-de la Cruz, R., Rojano-Delgado, A. M., Giménez, M. J., Cruz-Hipolito, H. E., Domínguez-Valenzuela, J. A., Barro, F., De Prado, R. (2016c). First resistance mechanisms characterization in glyphosate-resistant *Leptochloa virgata*. *Front. Plant Sci.*, 7: 1742, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01742>.
- Anderson, J. A., Matthiesen, L., Hegstad, J. (2004). Resistance to an imidazolinone herbicide is conferred by a gene on chromosome 6DL in the wheat line cv. 9804. *Weed Sci.*, 52: 83-90.
- Appleby, A. P., Olson, P. D., Colbert, D. R. (1976). Winter wheat yield reduction from interference by Italian ryegrass. *Agronomy Journal*, 68: 463-466.
- Arregui, M. C., Puricelli, E. (2008). Mecanismo de acción de plaguicidas. Ed. *Dow AgroSciences* Argentina, Buenos Aires.
- Ashigh, J., Rajcan, I., Tardif, F. J. (2008). Genetic of resistance to acetohidroxiacid synthase inhibitors in populations of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) from Ontario. *Weed Science*, 56: 210-215.
- Ashton, F. M., Craft, A. (1981). Mode of Action of Herbicides. Ed. *Wiley Interscience*, New York.
- Aufhaammer, W. (1973). Zur Ertragsbildung bei Winterroggen. *Z. Acker-und Pflanzenb.*, 137: 96-122.

- Avila-Garcia, W. V., Mallory-Smith, C. (2010). Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne*) populations also exhibit resistance to glufosinate. *Weed Science*, 59 (3): 305-309.
- Avila-Garcia, W. V., Sanchez-Olguin, E., Hulting, A. G., Mallory-Smith, C. (2012). Target-site mutation associated with glufosinate resistance in Italian ryegrass (*Lolium perenne* L. ssp. *multiflorum*). *Pest Manag. Sci.*, 68: 1248–1254.
- Ball, D. A., Young, F. L., Ogg Jr., A. G. (1999). Selective control of jointed goatgrass (*Aegilops cylindrical*) with imazamox in herbicide-resistant wheat. *Weed Technol.*, 13: 77-82.
- Bàrberi, P. (2004). Métodos preventivos y culturales para el manejo de malezas, en: Manejo de malezas para países en desarrollo Addendum I. Ladrada R. (ed.), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. En: <http://www.fao.org/docrep/007/y5031s/y5031s00>.
- Barrett, M. (2000). The role of cytochrome P450 enzymes in herbicide metabolism. Pages 25–37 in A. H. Cobbs and R. C. Kirkwood, eds. *Herbicides and Their Mechanisms of Action*. Sheffield, Great Britain: Sheffield Academic.
- Bastida, F., Menéndez, J. (2001). Producción integrada y manejo integrado de malas hierbas. En: *Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI* (eds. R. De Prado y J. Jorrín), 307-316. Universidad de Córdoba, España.
- BASF. (2013). Clearfield Technotes: Imidazolinone herbicides and the effects of low temperature stresses and/or frost. http://www.cropcare.com.au/Assets/525/2/TNClearfield-2013ImidazolinoneRDUpdate_Web.pdf (Date of access: 27/06/2017).
- BASF Corporation. (2014). Clearfield production system. Disponible en: <http://www.basf.com/group/corporate/en/innovations/publications/innovationaward/2001/clearfield>.
- BASF. (2017). The Clearfield Plus production system for wheat. <http://agproducts.basf.us/products/clearfield-plus-wheat.html> (Date of access: 11/07/2017).

- Bayer E, Gugel, K. H., Hagele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., Konig, W. A., Zahner, H. (1972). Stoffwechselprodukte von mikroorganismen. Phosphinothricin und phosphinothricin-alanyl-alanin. *Helv Chim Acta*, 55: 224–239.
- Bayer CropScience. (2017). Technical label of *Finale*®. <http://www.cropscience.bayer.es/Productos/Herbicidas/Finale.aspx> (Date of access: 11/07/2017).
- Berriault, J. N., Horsman, G. P., Devine, M. D. (1999). Phloem transport of D, L-glufosinate and acetyl-L-glufosinate in glufosinate-resistant and -susceptible *Brassica napus*. *Plant Physiol.*, 121: 619–627.
- Bernasconi, P., Woodworth, A. R., Rosen, B. A., Subramanian, M. V., Siehl, D. L. (1995). A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 17381-17385.
- Berner, D. A., Ikie, F. O., Green, L. M. (1997). ALS-inhibiting herbicide seed treatment control *Striga hermonthica* in ALS-modified corns (*Zea mays*). *Weed Technology*, 11: 704-707.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.*, 72: 248-254.
- Brady, T. M., Cross, B., Doehner, R. F., Finn, J., Ladner, D. L. (1998). The Discovery of imazamox, a new broad-spectrum imidazolinone herbicide. En: Baker, D. R. (ed.), American Chemical Society, Synthesis and Chemistry of Agrochemicals V. ACS Symposium Series, 686: 30.
- Bukun, B., Nissen, S. J., Shaner, D. L., Vassios, J. D. (2012). Imazamox absorption, translocation and metabolism in red lentil and dry bean. *Weed Sci.*, 60: 350-354.
- Carbonari, C. A., Latorre, D. O., Gomes, G. L., Veleni, E. D., Owens, D. K., Pan, Z., Dayan, F. E. (2016). Resistance to glufosinate is proportional to phosphinothricin acetyltransferase expression and activity in LibertyLink® and WideStrike® cotton. *Planta*, 243: 925-933.
- Cedergreen, N. (2014). Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS ONE*, 9(5): e96580.

- Cobb, A. (1992). Herbicides and plant physiology. London, England, UK: Chapman and Hall.
- Coble, H. D. (1996). Weed management tools and their impact on the agro-ecosystem. Proceedings of the 2nd International Weed Control Congress: 1143-1146.
- Colquhoun, J., Mallory-Smith, C., Ball, D. (2003). Weed management in Clearfield wheat with imazamox. Corvallis, Oregon State University Extension Publication (EM8833).
- Comisión Europea. (2002). Review report for the active substance imazamox. Disponible en: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/imazamox.pdf>.
- Comisión Europea. (2017). Agriculture and rural development. Disponible en: http://ec.europa.eu/agriculture/index_en.htm.
- Corbett, J. R., Wright, R., Bailie, A. C. (1994). The biochemical mode of action of pesticides. Academic Press, London.
- Coruzzi, G., Last, R. (2000). Amino acids. Biochemistry and Molecular Biology of Plants (eds. B. Buchanan, W. Gruissem y R. L. Jones), 358-411. John Wiley y Sons, New York.
- Coupland, D. (1991). The role of compartmentation of herbicides and their metabolites in resistance mechanisms. Herbicide Resistance in Weeds and Crops, (eds. Caseley JC, Cussans GW y Atkin RK), Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, 263-278.
- Cross, R., McCarty, L. B., Tharayil, N., McElroy, J. S., Chen, S., McCullough, P. E., Powell, B. A., Bridges, W. C. (2015). A Pro106 to Ala substitution is associated with resistance to glyphosate in annual bluegrass (*Poa annua*). *Weed Sci.*, 63: 613–622.
- Cruz-Hipólito, H., Osuna, M. D., Vidal, R. A., De Prado, R. (2009). Resistant mechanism to bensulfuron-methyl in biotypes of *Scirpus mucronatus* L. collected in Chilean rice fields. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 4273-4278.
- Cruz-Hipolito, H. E., Rosario, J., Ioli, G., Osuna, M. D., Smeda, R. J., González-Torralva, F., De Prado, R. (2013). Resistance mechanism to tribenuron-methyl in white mustard (*Sinapis alba*) from southern Spain. *Weed Sci.*, 61: 341–347.

- Davies, D. H. K., Welsh, J. P. (2002). Weed control in organic cereals and pulses. In: Younie, D.; Taylor, B.R.; Welch, J.M. and Wilkinson, J.M. (Eds.) Organic cereals and pulses. Papers presented at conferences held at the Heriot-Watt University, Edinburgh, and at Cranfield University Silsoe Campus, Bedfordshire, 6 and 9 November 2001. *Chalcombe Publications*, 5: 77-114.
- Dayan, F. E., Owens, D. K., Corniani, N., Lima-Silva, F. M., Watson, S. B., Howell, J. L., Shaner, D. L. (2015). Biochemical markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. *Weed Sci. Special Issue*: 23–63.
- Dec, J., Bollag, J. M. (2001). Use of enzymes in bioremediation. Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganism: Similarities and Divergences, (eds. Hall JC, Hoagland RE y Zablotowicz RM), ACS.
- De Prado, J. L. (2012). Mecanismos de resistencia a ureas sustituidas, FOPs y glicinas en *Lolium rigidum*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- De Prado, J. L., De Prado, R., Shimabukuro, R. H. (1999). The effect of diclofop on membrane potential, ethylene induction and herbicide phytotoxicity in resistant and susceptible biotypes of grasses. *Pest. Biochem. Physiol.*, 63: 14.
- De Prado, R., Sánchez, M., Jorrín, J., Domínguez, C. (1992). Negative cross-resistance to bentazone and pyridate in atrazine-resistant *Amaranthus cruentus* and *Amaranthus hybridus* biotypes. *Pestic Sci.*, 35: 131–136.
- De Prado, R., De Prado, J. L., Osuna, M. D., Taberner, A., Heredia, A. (2001). Is diclofop-methyl resistance in *Lolium rigidum* associated with a lack of penetration? *Proc. Crop Prot. Conf. Weed,s* 8: 545–550.
- De Prado, R., Franco, A. R. (2004). Cross-resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: biochemical and physiological aspect. *Weed Sci.*, 52: 115-120.
- Devine, M. D., Duke, S. O., Fedtke, C. (1993). Physiology of herbicide action, (ed. Prentice Hall), Englewood Cliffs, USA. 441.
- Devine, M. D., Shimabukuro, R. H. (1994). Resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides. Pages 141–169 in S. B. Powles and J.A.M. Holtum, eds. *Herbicide Resistance in Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Devine, M. D., Eberlein, C. V. (1997). Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites. En: Roe, R. M., Burton, J. D. y Kuhr, R. J., eds. *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*. Amsterdam, The Netherlands.
- Díez de Ulzurru, P., Leaden, M. I. (2012). Análisis de la sensibilidad de biotipos de *Lolium multiflorum* a herbicidas inhibidores de la enzima ALS, ACCasa y Glifosato. *Planta daninha*, 30 (3): 667-673.
- Duggleby, R. G., McCourt, J. A., Guddat, L. W. (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol. Biochem.*, 46: 309-324.
- Duhoux, A., Délye, C. (2013). Reference genes to study herbicide stress response in *Lolium* sp.: Up-regulation of P450 genes in plants resistant to acetolactate-synthase inhibitors. *PLoS ONE* 8, e63576, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063576>.
- Duke, S. O., Dayan, F. (2001). Clasificación and more of action of the herbicides. En: De Prado, R. y Jorrín, J. V. (eds). *Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI*, Universidad de Córdoba, España.
- Espinosa, N., Díaz, J., Galdames, R., Rodríguez, C., Gaete, N., De Prado, R. (2009). Estado de la resistencia a herbicidas en trigo y otros cultivos extensivos en el sur de Chile. INIA, Chile.
- Everman, W. J., Burke I. C., Allen J. R., Collins J., Wilcut J. W., (2009). Absorption, Translocation, and Metabolism of ¹⁴C-Glufosinate in Glufosinate-Resistant Corn, Goosegrass (*Eleusine indica*), Large Crabgrass (*Digitaria sanguinalis*), and Sicklepod (*Senna obtusifolia*). *Weed Sci.*, 57: 1-5.
- FAO. (2012). Inhibidores de aminoácidos de cadena ramificada: Imidazolinonas. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s=e.htm>.
- FAO. (2017). Estimaciones sobre la oferta y demanda cerealista. Disponible en: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>.
- FAOSTAT. (2018). Evolución de los cultivos de trigo. FAO.
- Feekes, W. (1941). De Tarwe en haar milieu. Vers. XVII. Tech. Tarwe Comn. *Groningen*, 506: 1.

- Fernández-Moreno, P. T. (2017). Resistencia cruzada y múltiple de malas hierbas a herbicidas. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Fischer, A. J., Bayer, D. E., Carriere, M. D., Ateh, C. M., Yim, K. O. (2000). Mechanisms of resistance to bispyribac-sodium in an *Echinochloa Phyllopogon* accession. *Pest. Biochem. Physiol.*, 68: 156-165.
- Gaines, T. A., Lorentz, L., Figge, A., Herrman, J., Maiwald, F., Ott, M. C. Han, H., Busi, R., Yu, Q., Powles, S. B., Beffa, R. (2014). RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. *Plant J.*, 78: 865–876.
- García-Torres, L., Fernández-Quintanilla, C. (1991). Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas. *Mundi-Prensa*, Madrid.
- Ge, X., d' Avignon, D. A., Ackerman, J. J. H., Sammons, R. D. (2010). Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanis. *Pest Manag. Sci.*, 66: 345–348.
- Goldringer, I., Brabant, P., Gallais, A. (1997). Estimation of additive and epistatic genetic variances for agronomic traits in a population of doubled-haploid lines of wheat. *Heredity*, 79: 60–71.
- González-Torres, Y. (2007). Etnografía del maíz: variedades, tipos de suelo, y rituales en treinta monografías. Etnografía de los confines. Andanzas de Anne Chapman, México, INAH, 179-220.
- Green, J. M. (2014). Current state of herbicides in herbicided resistant crops. *Pest management science*, 70 (9): 1351-1357.
- Gressel, J., Valverde, B. E. (2009). A strategy to provide long-term control of weedy rice while mitigating herbicide resistance transgene flow, and its potential use for other crops with related weeds. *Pest Management Science*, 65: 723-731.
- Gronwald, J. W. (1994). Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. En: “Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry”, (eds. Powles SB y Holtum JAM), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 27-60.
- Guerrero, A. (1977). Cultivos herbáceos extensivos. *Mundi-Prensa*, Madrid.

- Haigh, T. (2000). Weed competition and control. Disponible en: <http://www.uws.edu.au/vip/haight/vegintroduction.htm>. Accessed by May 2007.
- Hanson, B. D., Shaner, D. L., Westra, P., Nissen, S. J. (2006). Response of selected hard red wheat lines to imazamox as affected by number and location of resistance genes, parental background, and growth habit. *Crop Sci.*, 46: 1206–1211.
- Hatami, Z. M., Gharekhloo, J., Rojano-Delgado, M. A., Osuna, M. D., Alcántara, R., Fernández, P., Sadeghipour, H. R., De Prado, R. (2016). Multiple mechanisms increase levels of resistance in *Rapistrum rugosum* to ALS herbicides. *Front. Plant Sci.*, 7: 169.
- Hattori, T., Vasil, V., Rosenkrans, L., Hannah, L. C., McCarty, D. R., Vasil, I. K. (1992). The viviparous-7 gene and abscisic acid activate the C7 regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Dev.*, 6: 609-618.
- Hatzios, K. K. (1991). Biotransformations of herbicides in higher plants. *Environmental Chemistry of Herbicides*, (eds. Grover R and Cessna AJ), Boca Raton, FL, CRC Press, 141-185.
- Heap, I. (2002). International survey of herbicide resistant weeds. *Annual Report Internet*. <http://www.weedscience.com>.
- Heap I (2011) Current global status of herbicides resistant weeds. Disponible en: <http://www.weedscience.org>.
- Hejtmánková, K., Lachman, J., Hejtmánková, A., Pivec, V., Janovská, D. (2010). Tocols of selected spring wheat (*Triticum aestivum* L.), einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.) and wild emmer (*Triticum dicoccum* Schuebl [Schrack] varieties. *Food chem.*, 123: 1267-1274.
- Hess, F. D. (1985). Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerance and susceptibility. *Weed Physiology: Herbicide Physiology*, vol. II, (eds. Duke SO), CRC Press, Boca Raton, 192-214.
- Hess, F. D. (1994). Research needs in weed science. *Weed Technology*, 8: 408-409.
- Hinrichsen, P., Opitz, X., Ramírez, I., Muñoz, C. (1997). Identificación de cultivares chilenos de trigos de pan (*Triticum aestivum* L.) y trigos candeales (*Triticum durum* Def.) basada en perfiles electroforéticos de gliadinas. *Agricultura Técnica (Chile)*, 57: 102-112.

- Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M. (1998). Biotransformation of fenoxaprop-ethyl by fluorescent pseudomonas. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4759-4765.
- Hoerlein, G. (1994). Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Rev. Environ. Contam.*, 138: 73-145.
- Holm, L. G., Plucknett, D. L., Pancho, J. V., Herberger, J. P. (1977). The World's Worst Weeds: Distribution and Biology. The University Press of Hawaii, Honolulu, 609.
- Holt, J. S., Lebaron, H. M. (1990). Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technol.*, 4: 141-149.
- Horovitz, N. (1939). Descripción de variedades agrícolas de trigo por sus caracteres morfológicos. *Publ. Estac. Exp.*, 6: 1-130.
- HRAC. (2008). Classification of herbicides according their mode of action. <http://www.plantprotection.org/HRAC>.
- Hulme, P. E. (2012). Weed risk assessment: a way forward or a waste of time? *Journal of Applied Ecology*, 49: 10-19.
- Inclendon, B. J., Hall, J. C. (1997). Enzymatic de-esterification of xenobiotics in plants. Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants, (eds. Hatzios KK), NATO ASI Series, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 67-82.
- Jabran, K., Mahmood, K., Melander, B., Bajwa, A. A., Kudsk, P. (2017). Weed dynamics and management in wheat. *Advances in Agronomy*, doi: 10.1016/bs.agron.2017.05.002.
- Jalaludin, A., Yu, Q., Zoellner, P., Beffa, R., Powles, S. B. (2017). Characterisation of glufosinate resistance mechanisms in *Eleusine indica*. *Pest Manag Sci.*, 73: 1091-1100.
- Jander, G., Baerson, S. R., Hudak, J. A., González, K. A., Gruys, K. J., Last, R. L. (2003). Ethylmethanesulfate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiology*. 131: 139-146.
- Jiménez, F. (2016). Resistencia de cultivares de trigo (*T. aestivum* L.) a imazamox: Aspectos fisiológicos, bioquímicos y agronómicos. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

- Jiménez, F., Fernández, P., Rojano-Delgado, A. M., Alcántara, R., De Prado, R. (2015). Resistance to imazamox in Clearfield soft wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Prot.*, 78: 15-19.
- Jimenez, F., Rojano-Delgado, A. M., Fernández, P. T., Rodríguez-Suárez, C., Atienza, S. G., De Prado, R. (2016). Physiological, biochemical and molecular characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in wheat. *Physiol. Plant.*, 158: 2–10.
- Jonard, P., Koller, J. (1951). Les facteurs de la productivité chez le blé. Ann. De L'INRA, série B, Ann. *De l'Amélioration des Plantes*, 1: 256-276.
- Justum, A. R., Graham, J. C. (1995). Managing weed resistance: the role of the agrochemical industry. *Proceeding of the Brighton Crop Protection Conference Weeds*, 557-566.
- Kimber, G., Sears, E. R. (1987). Evolution in the genus *Triticum* and the origin of cultivated wheat. In: Wheat and wheat improvement. E. G. Heye (ed.), *American Society of Agronomy*, 13: 154-164. Madison, Wisconsin.
- Kirby, E. J. M., Appleyard, M. (1984). Cereal plant development and its relation to crop management. In: Cereal Production. E. J. Gallagher (ed.), 161-173. Butterworths, London.
- Kolkman, J. M., Slabaugh, M. B., Bruniard, J. M., Berry, S., Bushman, B. S., Olungu, C., Maes, N., Abratti, G., Zambelli, A., Miller, J. F., León, A., Knapp, S. J. (2004). Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. *Theor. Appl. Genet.*, 109: 1147–1159.
- Krieger, R. (2001). Handbook of Pesticide Toxicology: Principles and Agents. *Academic Press*, San Diego.
- Kumaratilake, A. R., Lorraine-Colwill, D. F., Preston, C. (2002). A comparative study of glufosinate efficacy in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) and sterile oat (*Avena sterilis*). *Weed Sci.*, 50:560–566.

- Lamichhane, J. R., Devos, Y., Beckie, H. J., Owen, M. D. K., Tillie, P., Messéan, A., Kudsk, P. (2017). Integrated weed management systems with herbicide-tolerant crops in the European Union: lessons learnt from home and abroad. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 37: 459–475.
- Lamoureux, G. L., Frear, D. S. (1987). Current problems, trends, and developments in pesticide metabolism in plants. In Pesticide Science and Technology. Eds. R. Greenhalgh and T.R. Roberts. *Blackwell Science Publishers*, Oxford, 455-462.
- Large, E. C. (1954). Growth Stages in Cereals. Illustration of the Feekes Scale. *Plant Path.*, 3: 128-129.
- Lebaron, H., Gressel, J. (1982). Herbicide Resistance in Plants. John Wiley and Sons, New York.
- Lee, H., Rustgi, S., Kumar, N., Burke, I., Yenish, J. P., Gill, K. S., Wettstein, D., Ullrich, S. E. (2011). Single nucleotide mutation in the barley acetohydroxy acid synthase (AHAS) gene confers resistance to imidazolinone herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108: 8909–8913.
- Lersten, N. R. (1987). Morphology and anatomy of the wheat plant. In: Wheat and wheat improvement. E. G. Heyne (ed.), American Society of Agronomy, 13: 33-71, Madison, Wisconsin.
- Levitt, G. (1978). Herbicidal sulfonamides. US patent 4127405.
- Li, D., Barclay, I., Jose, K., Stefanova, K., Appels, R. (2008). A mutation at the Ala122 position of acetohydroxyacid synthase (AHAS) located on chromosome 6D of wheat: improved resistance to imidazolinone and a faster assay for marker assisted selection. *Mol. Breeding*, 22: 217–225.
- Liu, M., Hulting, A. G., Mallory-Smith, C. A. (2013). Characterization of multiple-herbicide-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* spp. *multiflorum*). *Pest Manag Sci.*, 70: 1145–1150.
- López-Bellido, L. (1991). Cultivos herbáceos: Cereales. *Mundi-Prensa*, Madrid. 539.
- Lorente Ibañez, F. A. (2003). Nuevo herbicida (Imazamox) para el control de Jopo (*Orobanche* sp.) y otras hierbas en girasol Clearfield. *Phytoma España*, 152: 78-84.

- MAGRAMA. (2016). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Hojas divulgadoras Núm.2120 HD. Métodos para el control de malas hierbas. (II) Físicos y Biológicos. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_2006_2119-2120.pdf.
- Mallory-Smith, C. A., Retzinger Jr., E. J. (2003). Revised Classification of Herbicides by Site of Action for Weed Resistance Management Strategies. *Weed Technol.*, 17: 605-619.
- Manabe, Y., Tinker, N., Colville, A., Miki, B. (2007). CSR1, the sole target of imidazolinone herbicide in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 48: 1340–1358.
- Mansager, E. R., Swanson, H. R., Tanaka, F. S. (1983). Metribuzin metabolism in tomato: isolation and identification of N-glucoside conjugates. *Pest. Biochem. Physiol.*, 19: 270-281.
- Matz, S. A. (1991). Chemistry and Technology of cereals as food and feed. Ed. Springer, Berlín.
- Maume, L., Dulac, J. (1942). Observations sur la physiologie de la nutrition du blé au cours de périodes critiques. *Annales Agro.*, 193-225.
- Menéndez, J. (1997). Mecanismos de resistencia a herbicidas en biotipos de *Alopecurus myosuroides* Huds. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, España.
- Menendez, J., Rojano-Delgado, A., De Prado, R. (2014). Differences in herbicide uptake, translocation, and distribution as sources of herbicide resistance in weeds in Retention, uptake, and translocation of agrochemical in plants (eds Myung, K., Satchivi, N.M. & Kingston C. K.) 141–157 (ACS Publications, 2014).
- Metzler, M. J., Ahumada, M. (2016). Manejo de *Lolium multiflorum* (raigrás anual) resistente a glifosato mediante el uso de herbicidas preemergentes. INTA PARANÁ. ISSN: 0325-8874.
- Michitte, P., Gauvrit, C., Heredia, A., De Prado, R. (2004). Resistance to glyphosate in *Lolium multiflorum*: involvement of epicuticular waxes? XII Colloque International Sur La Biologie Des Mauvaises Herbes., 597-602.

- Miller, J. F., Al-Khatib, K. (2002). Registration of imidazolinona herbicide resistant sunflower maintainer (Ha 425) and fertility restorer (RHA 426 y RHA 427) germplasm. *Crop Sci.*, 42: 988-989.
- Moss, S. R. (2002). Herbicide resistant weeds. En: Naylor RE (ed) British Crop Protection Council, 225.
- Newhouse, K. E., Smith, W. A., Starrett, M. A., Shaefer, T. J., Singh, B. K. (1992). Tolerance to imidazolinone herbicide in wheat. *Plant Physiol.*, 100: 882-886.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *J. Agr. Sci.*, 144: 31-43.
- Ohba, K., Monoura, M., Safarpour, M. M., Picard, G. L., Safarpour, H. (1997). Method for determination of imazamox and its two hydroxyl and glucose conjugate metabolites in adzuki beans by capillary electrophoresis. *J. Pestic. Sci.*, 22: 277-281.
- Osuna, M. D., De Prado, R. (2003). *Conyza albida*: a new biotype with ALS inhibitor resistance. *Weed Res.*, 43: 221-226.
- Owen, W. J., Pallutt, B. (1991). How the crop rotation affects weeds. *Pflanzenschutz Praxis*, 3: 14-16.
- Pang, S. S., Duggleby, R. G., Guddat, L. W. (2002). Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *Journal of Molec. Biology*, 317 (2): 249-262.
- Patzoldt, W. L., Tranel, P. J., Alexander, A. L., Schmitzer, P. R. (2001). A common ragweed population resistant to cloransulam-methyl. *Weed Science*, 49 (4): 485-490.
- Pedrerros, A. (2001). Wild oat (*Avena fatua* L.) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) effect on wheat yield at two locations. *Agricultura Técnica* (Chile), 61: 294-305.
- Perez-Jones, A., Martins, B. A. B., Mallory-Smith, C. A. (2010). Hybridization in a commercial production field between imidazolinone-resistant winter wheat and jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) results in pollen-mediated gene flow of Imi1. *Weed Sci.*, 58: 395-401.
- Pester, T. A., Nissen, S. J., Westra, P. (2001). Absorption, translocation, and metabolism of imazamox in jointed goatgrass and feral rye. *Weed Sci.*, 49: 607-612.

- Pfenning, M., Palfay, G., Guillet, T. (2008). The Clearfield technology, a new broad-spectrum post-emergence weed control system. *J. Plant Dis. Project.*, 21: 649-663.
- Pillmoor, J. B., Caseley, J. C. (1984). The influence of growth stage and foliage or soil application on the activity of AC 222,293 against *Alopercurus myosuroides* and *Avena fatua*. *Ann. Appl. Biol.*, 105: 517-527.
- Pimentel, D., McNair, S., Janecka, J., Wightman, J., Simmonds, C., O'Connell, C., Wong, E., Russel, L., Zern, J., Aquino, T., Tsomondo, T. (2001). Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture Ecosystem and Environment*, 84: 1-20.
- Plana, R. (2013). Comunicación corta: evaluación de una colección de variedades de trigo (*Triticum aestivum*) resistentes a *Helminthosporium sativum* en el occidente de Cuba. *Cultivos Tropicales*, 22: 29-31.
- Pont, V., Collet, G. F. (1980). Métabolisme du chloro-2-(p-chlorophényl)-3 propionate de méthyle et problème de sélectivité. *Phytochem.*, 19: 1361-1363.
- Pornprom, T., Prodmatee, N., Chatchawankanphanich, O. (2009). Glutamine synthetase mutation conferring target-site-based resistance to glufosinate in soybean cell selections. *Pest Manag. Sci.*, 65: 216-222.
- Powles, S. B., Preston, C., Bryan, I. B., Jutsum, A. R. (1997). Herbicide resistance: impact and management. *Adv. Agron.*, 58: 57-93.
- Powles, S. B., Yu, Q. (2010). Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61: 317-347.
- Pozniak, C. J., Birk, I. T., O'Donoghue, L. S., Ménard, C., Hucl, P. J., Singh, B. K. (2004). Physiological and molecular characterization of mutation-derived imidazolinona resistance in spring wheat. *Crop Sci.*, 44: 1434-1443.
- Pozniak, C. J., Hucl, P. J. (2004). Genetic analysis of imidazolinone resistance in mutation-derived lines of common wheat. *Crop Sci.*, 44: 23-30.
- Pujadas, A., Hernández, J. E. (1988). Concepto de mala hierba. *ITEA*, 75: 47-56.
- RAIF. (2014). Red de Alerta e Información Fitosanitaria. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Principales malas hierbas en el cultivo del trigo duro.

Disponible en: http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/export/sites/default/comun/galeriasDescargas/minisites/raif/Fichas_Fitopatologicas/TRIGODURO_MALASHIERBAS.pdf.

Rawson, H. M., Gómez-Macpherson, H. (2001). Trigo regado: Manejo del cultivo. FAO.

Recasens, J., Conesa, J. A. (2009). Malas hierbas en plántula. Guía de identificación. Ed. Universitat de Lleida.

Reilly, M. L. (1990). Nitrate assimilation and grain yield. In Nitrogen in higher plants. Y. P. Abrol (ed.), 335-366. Wiley and Sons, Gran Bretaña.

Retzinger, E. J., Mallory-Smith, C. (1997). Classification of herbicides by site of action for weed resistant managements strategies. *Weed Technology*, 11: 384-393.

Rhodes, D., Rendon, G.A., Stewart, G.R. (1975). The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta*, 125: 201–211.

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D. (2015). Dose-response analysis using R. PLoS One 10, e0146021.

Rodríguez-Castellanos, L., Sánchez-Hernandez, J. (2007). Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. *J. Pest. Sci.*, 32: 360–371.

Rodríguez-Rivera, V. M., Simón-Magro, E. (2008). Bases de la alimentación humana. Ed. Netbiblo, S. L.

Rodríguez-Suárez, C., Ramírez, M. C., Martínez, S., Nadal, A., Martín, S., Atienza, G. (2009). Selection and molecular characterization of imidazolinone resistant mutation-derived lines of *Tritordeum* HT621. *Mol. Breeding*, 23: 565–572.

Rojano-Delgado, A. M., Cruz-Hipólito, H., De Prado, R., Luque de Castro, M. D., Franco, A. R. (2012). Limited uptake, translocation and enhanced metabolism degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna Pruriens* var. Utilis plants. *Phytochem.*, 73: 34-41.

Rojano-Delgado, A. M., Priego-Capote, F., Barro, F., Luque de Castro, M. D., De Prado, R. (2013). Liquid chromatography–diode array detection to study the metabolism of glufosinate in *Triticum aestivum* T-590 and influence of the genetic modification on its resistance. *Phytochemistry*, 96: 117-122.

- Rojano-Delgado, A. M., Menendez, J., De Prado, R. (2014a). Absorption and penetration of herbicide viewed in metabolism studies: Case of glufosinate and imazamox in wheat in Retention, uptake, and translocation of agrochemical in plants (eds Myung, K., Satchivi, N.M. & Kingston C. K.) 159–165 (ACS Publications, 2014).
- Rojano-Delgado, A. M., Priego-Capote, F., De Prado, R., Luque de Castro, M. D. (2014b). Ultrasound-assisted extraction with LC–TOF/MS identification and LC–UV determination of imazamox and its metabolites in leaves of wheat plants. *Phytochem. Anal.*, 25: 357–363.
- Rojano-Delgado, A. M., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M. D., De Prado, R. (2015). Mechanism of imazamox resistance of Clearfield wheat cultivar for better weed control. *Agron. Sustain. Dev.*, 35: 639-648.
- Rubin, B. (1991). Herbicide resistance in weeds and crops, progress and prospects. En: Herbicide Resistance in Weeds and Crops (eds. J. C. Caseley, G. W. Cussans y R. K. Atkin, eds.) 387-414, Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Ruiz-Santaella, J. P., Heredia, A., Osuna, M. D., De Prado, R. (2004). Influence of cuticular waxes in the absorption of cyhalofop-butyl in *Oryza sativa* L. and *Echinochloa oryzoides* populations. Proceedings of the Conference Challenges and Opportunities for Sustainable Rice-based. *Production Systems*, 169-176.
- Saari, L. L., Cotteaman, J. C., Thill, D. C. (1994). Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. En: Powles, S. B. y Holtum, J. (eds). Herbicide Resistance in Plants.
- Saari, L. L., Mauvais, C. J. (1996). Sulfonylurea herbicide-resistant crops. En: Duke, S. O. (ed) Herbicide Resistant Crops. CRC Press, Boca Ratón.
- Sanyal, D., Bhowmik, P. C., Anderson, R. L., Shrestha, A. (2008). Revisiting the perspective and progress of integrated weed management. *Weed Sci.*, 56: 161–167.
- Sauer, H., Wild, A., Riihle, W. (1987). The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. The causes of inhibition of photosynthesis. *Z Naturforsch*, 42: 270-287.
- Scarabel, L., Cenghialta, C., Manuello, D., Sattin, M. (2012). Monitoring and management of imidazolinone-resistant red rice (*Oryza sativa* L., var. *sylvatica*) in Clearfield® Italian paddy rice. *Agronomy*, 2: 371–383.

- Schmidt, R. R. (2005). Clasificación de los herbicidas según su modo de acción. Disponible en: www.plantprotection.org/HRAC/Spanish_clasification.html.
- Scott, P. (2013). Physiology and behaviour of plants. Ed. John Wiley and Sons, New York.
- Seefeldt, S. S., Zemetra, R., Young, F. L., Jones, S. S. (1998). Production of herbicide-resistant jointed goatgrass (*Aegilops cylindrical*) x wheat (*Triticum aestivum*) hybrids in the field by natural hybridization. *Weed Sci.*, 46: 632-634.
- Shaner, D. L., Anderson, P. C., Stidman, M. A. (1984). Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol.*, 76: 545-546.
- Shaner, D. L. (2009). Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Sci.*, 57: 118-23.
- Shaner, D. L., Beckie, H. J. (2014). The future for weed control and technology. *Pest Management Science*, 70 (9): 1329-1339.
- Sherman, T. D., Vaughn, K. C., Duke, S. O. (1996). Mechanism of action and resistance to herbicides. *Herbicide Resistant Crops*, (eds. Duke SO), CRC Press, Boca Raton. 14-28.
- Shimabukuro, R. H. (1985). Detoxification of herbicides. *Weed Physiology*, Vol. 2, (eds. Duke SO), Boca Raton, FL: CRC Press, 215-240.
- Shimabukuro, R. H., Hoffer, B. L. (1997). Perturbation of the transmembrane proton gradient and resistance to AOPP herbicides. En: De Prado, R., Jorrín, J. y García-Torres, L. (eds) *Weed and crop resistance to herbicides*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 71.
- Simmons, S. R. (1987). Growth, development, and Physiology. Chapter 3. In: E. G. Heyne, ed. *Wheat Improvement*, Edition 2. ASA Inc, CSSA, Inc and SSS of America Inc., Madison Wisconsin, 77-104.
- Tachibana, K., Watanaba, T., Seikizawa, Y., Takematsu, T. (1986). Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J. Pestic Sci.*, 11: 33-37.
- Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K., Shaner, D. L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.*, 61: 246-257.

- Thompson, C., Tar'an, B. (2014). Genetic characterization of the acetohydroxyacid synthase (AHAS) gene responsible for resistance to imidazolinone in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 127: 1583–1591.
- Tomás-Alvear, M. I. (2007). Sistema Clearfield®, la tecnología del futuro en el control de malas hierbas. *Phytoma España*, 192: 23-26.
- Torner, C., Aibar, J., Bellostas, A., De Lucas, C., Esparza, M., Fernández-Quintanilla, C., Gonzalez-Andujar, J. L., Gonzalez-Ponce, R., Izquierdo, J., Navarrete, L., Royuela, M., Salas, M. L., Sánchez Del Arco, M. J., Santin, I., Tiebas, M. A., Vitta, J., Zaragoza, C. (1999). Conclusiones de los trabajos sobre competencia de las malas hierbas con los cereales de invierno en España. *Actas del Congreso 1999 de la Sociedad Española de Malherbología*, 205-211.
- Tranel, P. J., Wright, T. R. (2002). Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned? *Weed Science.*, 50: 700-712.
- Tsai, C. J., Wang, C. S., Wang, C. Y. (2006). Physiological characteristics of glufosinate resistance in rice. *Weed Sci.*, 54:634–640.
- USDA. (2016). Wheat. Disponible en: <http://www.ers.usda.gov/topics/crops/wheat/usda-wheat-baseline,-2015-24.aspx#World>.
- Vila-Aiub, M. M., Neve, P., Powles, S. B. (2009). Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytol.*, 184: 51–767.
- Villalba, A. (2009). Resistencia a herbicidas. Glifosato. Ciencia, Docencia y Tecnología, 39 (20): 169-186.
- Wyse, D. L. (1978). Weed science, lecture notes. Dept. of Agronomy and plant genetics. University of Minnesota, 189.
- Yao, C., Myung, K., Wang, N., Jhoson, A. (2014). Spray retention of crop protection agrochemicals on the plant surface in Retention, uptake, and translocation of agrochemical in plants (eds Myung, K., Satchivi, N.M. & Kingston C. K.) 1–22 (ACS Publications, 2014).
- Yu, Q., Powles, S. B. (2014). Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Manag. Sci.*, 70: 1340-1350.

Yuan, J. S., Tranel, P. J., Stewart, C. N. J. (2007). Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci.*, 12: 6–13.

Zadoks, J. C., Chang, T. T., Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14: 415-421.

Zollinger, R. (2003). Innovaciones en control de malezas en girasol. En 2º Congreso Argentino de Girasol de la Asociación Argentina de Girasol, Buenos Aires, Argentina. En: <http://www.asagir.org.ar/asagir2008/pdf/1-Malezas.pdf>.

Zwerger, P. (1996). Integrated pest management in developed nations. Proceedings of the 2nd International Weed Control Conference, 993-942.

ANEXO

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Multiple mechanisms are involved in new imazamox-resistant varieties of durum and soft wheat

Received: 28 March 2017

Accepted: 3 October 2017

Published online: 01 November 2017

Rafael Domínguez-Méndez¹, Ricardo Alcántara-de la Cruz², Antonia M. Rojano-Delgado¹, Pablo T. Fernández-Moreno³, Raphael Aponte³ & Rafael De Prado¹

Weed control in wheat is one of the major goals of farmers in their efforts toward obtaining the highest crop yields for human foods. Several studies (dose-response, enzyme activity, absorption-translocation and metabolism) were conducted to characterize the resistance level of two new wheat cultivars called Rafalin (*Triticum aestivum*) and Antoñín (*T. durum*) that were obtained by conventional breeding based on Clearfield® technology; they are resistant (R) to imazamox compared to their sensitive (S) counterparts (Gazul and Simeto, respectively). The R-cultivars were 93.7-fold (Rafalin) and 43.7-fold (Antoñín) more resistant than their respective S-cultivars. The acetolactate synthase (ALS) enzyme activity revealed high resistance to imidazolinone (IMI) herbicides in R-cultivars, but no cross-resistance to other ALS herbicides was found. The Ser653Asn mutation that confers resistance to IMI herbicides was identified in the *imi2* and *imi2* genes of Rafalin and only in the *imi2* gene of Antoñín. The ¹⁴C-imazamox absorption did not differ between the R- and S-cultivars. Imazamox was metabolized by Cyt-P450 into imazamox-hydroxyl and imazamox-glucoside in the R-cultivars, altering their translocation patterns. The differential sensitivity to imazamox between R-cultivars was due to the number of resistance genes that carry each genotype. The R-cultivars Rafalin and Antoñín could be excellent weed control tools.

Wheat (*Triticum* sp.) is the second most cultivated cereal in the world after maize¹. Weeds are one of the primary biotic factors in crop production, competing for soil, water, light and nutrients². In the case of wheat cultivation, they can cause a yield reduction of up to 50%³.

Since the emergence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in the mid-1940s⁴, weed control in wheat has improved thanks to the availability of a variety of selective active ingredients belonging to different chemical families, among which the following should be mentioned: 2,4-D, MCPA, MCPP, bentazon, bromoxynil, isoxynil, diclofop, fenoxaprop, clodinafop, iodosulfuron, mesosulfuron, pinoxaden, etc. Another weed control modality in crops is the use of non-selective herbicides (broad spectrum), for which it is necessary to choose wheat varieties that are resistant to the active herbicide ingredients^{5,6}.

In recent years, some crop varieties with resistance to imidazolinone (IMI) herbicides [acetolactate synthase (ALS, EC 2.2.1.6; also known as acetohydroxyacid synthase: AHAS) inhibitors group] have been developed. These herbicides are classified as broad-spectrum weed control. These crops are known as "IMI varieties", and their development primarily involves Clearfield® technology⁷. IMI-resistant crops can be grown from two to a maximum of four years in the same field to reduce the risk of developing herbicide-resistant weeds⁸.

In most cases, resistance to ALS-inhibiting herbicides is due to a mutation at the site of action, although there are some cases in which the responsible mechanism is a rapid detoxification of the herbicide by the plant's metabolism^{9–11}. Regarding exchanges in the ALS gene that confer resistance to ALS-inhibiting herbicides, eight have been described, and they result in exchanges in the amino acid positions Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Arg377, Trp574, Ser653 and Ser654¹⁰. The Trp574Gly mutation confers cross-resistance to the entire family of ALS-inhibiting herbicides, while the mutations in the Pro197Ser or Pro197Ala codons are more resistant to the sulfonylurea family. The exchanges Ala122Thr, Ala205Val, Ser653Asn and Ser653Thr confer resistance to IMI;

¹Department of Agricultural Chemistry and Edaphology, University of Córdoba, 14071, Córdoba, Spain.

²Departamento de Entomologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Brazil. ³BASF SE, Agricultural Products, 67117, Limburgerhof, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.A.-d. (email: ricardo.la@ufv.br)

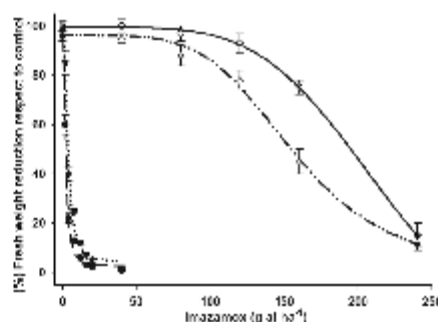


Figure 1. Dose-response curves of the fresh weight reduction with respect to untreated control plants of imazamox-susceptible and imazamox-resistant cultivars from the different soft (*Triticum aestivum*) and durum (*Triticum durum*) wheat varieties when evaluated at 30 DAA. Vertical bars \pm standard error ($n = 10$).

Variety	Cultivar	c	d	b	R^2 aj	β -value	GR ₅₀ (CI95)	RF
Soft	Rafalín (R)	99.5	-0.6	4.7	0.99	<0.0001	224.8 (17.6)	93.7
	Gazul (S)	96.2	2.4	2.36	0.99	0.0011	2.4 (0.6)	—
Durum	Antoñín (R)	96.2	0.4	4.7	0.98	0.0176	157.2 (12.9)	43.7
	Simeto (S)	99.9	4.1	2.2	0.97	0.0072	3.6 (1.1)	—

Table 1. Parameters of the sigmoidal equation used to estimate the imazamox dose (g ai ha⁻¹) needed to reduce the weight of a population by 50% (GR₅₀) in susceptible and resistant wheat cultivars of the soft (*Triticum aestivum*) and durum (*Triticum durum*) varieties. c = lower limit, d = upper limit, b = Hill's slope, R^2 aj = 1 - (sums of squares of the regression/corrected total sums of squares). RF = Resistance factor = GR₅₀R/GR₅₀S. CI95 values are the upper and lower limits (\pm) of the 95% confidence intervals ($n = 10$).

Ala122Thr confers even higher levels of resistance to IMI than exchanges involving Ser653¹². In IMI-resistant crops, the increase in resistance is a consequence of having two or more resistant genes in a single genotype¹³.

Durum wheat (*Triticum durum*) is tetraploid (28 chromosomes), while soft wheat (*T. aestivum*) is hexaploid (42 chromosomes)¹⁴. Three homologous genes of ALS in wheat have been identified, and they are known as *imi1*, *imi2* and *imi3* (also known as *ahasl-B1*, *ahasl-D1* and *ahasl-A1*, respectively). These genes are located in chromosomes 6B, 6D, and 6A, respectively^{13,15}.

Wheat varieties that are resistant to herbicides are an attractive alternative for weed control¹⁶, and they improve production. Several studies have demonstrated that GM crops do not have side effects on non-target organisms^{17,18}. However, EU bureaucracy and adoption challenges may lead to an uphill struggle for marketing GM wheat varieties¹⁹. Obtaining new herbicide-resistant wheat varieties by conventional plant breeding could facilitate their implementation and acceptance by the EU bureaucracy.

The aim of this work was to determine the IMI herbicide resistance levels of two new wheat cultivars (soft var. Rafalín and durum var. Antoñín) that were obtained by conventional crossbreeding with susceptible Spanish cultivars and to characterize the relevant resistance mechanisms.

Results

Foliar retention. The mean imazamox solution amounts retained on the leaves of the different wheat plants were 103 ± 2.1 , 92 ± 7.9 , 96 ± 4.5 and $90 \pm 8.1 \mu\text{L g}^{-1}$ dry weight in Gazul, Rafalín, Simeto and Antoñín, respectively, with no differences between them.

Dose-response and ALS activity tests. Imazamox resistance was confirmed in the two new Rafalín and Antoñín cultivars. Data on the fresh plant weights fit well to the log-logistic non-linear regression model, allowing for the estimation of effective mean doses that reduced the fresh weight by 50% (GR₅₀). Soft wheat cultivars presented GR₅₀ values of 2.4 and 224.8 g ai ha⁻¹ for imazamox in Gazul and Rafalín, respectively. In addition, the GR₅₀ of the durum wheat cultivars were 3.6 and 157.2 g ai ha⁻¹ for Simeto and Antoñín, respectively. The resistance factors (RF) of the R-cultivars were 43.7 and 93.7 for Antoñín and Rafalín, respectively, relative to their corresponding S-cultivars (Fig. 1, Table 1).

The specific *in vitro* activities of the ALS enzyme in Gazul, Rafalín, Simeto and Antoñín were 287, 276, 302 and 293 nmol acetoin mg⁻¹ protein h⁻¹, respectively, with no significant differences. The imazamox inhibited the ALS activity in all the cultivars as the concentrations increased. To inhibit the ALS activity by 50% (I₅₀), 3.8 and 5.3 μM imazamox were required for Gazul and Simeto (S-cultivars), respectively. The R-cultivars Antoñín and Rafalín presented RFs that were 13.8 and 82.7 times higher, respectively, relative to their corresponding S-cultivar.

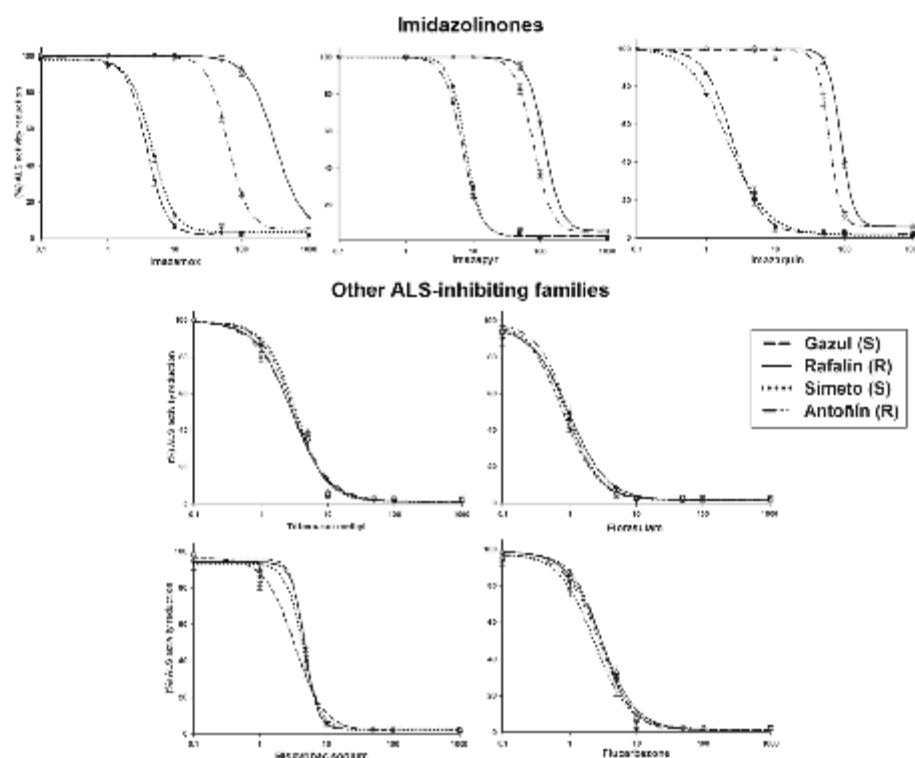


Figure 2. Log-logistic curves of five ALS inhibitor families on the ALS activity in imazamox-susceptible and imazamox-resistant plants of the soft (*Triticum aestivum*) and durum (*Triticum durum*) wheat varieties. Vertical bars \pm standard error ($n = 3$).

The R-cultivars showed multiple resistance to herbicides in the IMI family; however, they were not resistant to the other families of ALS inhibitor herbicides (Fig. 2, Table 2).

According to the 95% confidence intervals (CI), the S-cultivars showed no significant differences in either the GR_{50} or I_{50} parameters. Independent of the wheat variety, the Rafalín cultivar is the one that withstands a higher dose of imazamox.

ALS sequencing. The predicted amino acid sequence of S cultivars was presented as the same consensus of accessions *imi1*-AY210407 and *imi2*-AY210408 in wheat, corresponding to the *imi1* and *imi2* genes, respectively. The R-cultivar Rafalín presented two mutations at the Ser653 position (also known as Ser627^{15,16}) in the *imi1* and *imi2* genes, whereas the Antoñín cultivar presented the same mutation, but in the *imi2* gene. The codon change was AAC to AGC, resulting in an amino acid substitution from serine to asparagine. No mutation was found in the *imi3* gene (Fig. 3).

¹⁴C-Imazamox absorption and translocation. The four wheat cultivars presented a high ¹⁴C-imazamox absorption rate. At 12 h after application (HAA), the S-cultivars presented an absorption level of over 87%, absorbing up to more than 94% at 96 HAA, while the R cultivars exhibited an average absorption of 73 and 88% at 12 and 96 HAA, respectively. Although the S-cultivars absorbed more ¹⁴C-imazamox, the differences were not significant with respect to the R-cultivars (Fig. 4a).

The S-cultivars showed high rates of ¹⁴C-imazamox translocation from the treated leaves to the rest of the plants and roots. The greatest differences in translocation were observed at 96 HAA. The rates of translocation to the roots of the R-cultivars were 16.1 and 16.6% for Rafalín and Antoñín, respectively, for the absorbed herbicide, translocating 8.5–10.3% less herbicide to the roots than the S-cultivars and retaining approximately 60% in the treated leaves of both imazamox-resistant cultivars. At that time, the S-cultivars presented a higher translocation of ¹⁴C-imazamox from the treated leaves to the rest of the plants and roots (Table 3).

Herbicide	Cultivar	c	d	b	R ² aj	P-value	I ₅₀ (CI95)	RF ^b
Imidazolinones								
Imazamox	Rafalín	100.0	4.2	2.1	1.00	<0.0001	314.1 (23.7)	82.7
	Gazul	98.3	2.0	2.9	0.99	<0.0001	3.8 (0.93)	—
	Antioñín	99.7	4.9	2.9	0.99	<0.0001	62.3 (8.2)	13.8
	Simeto	98.3	3.4	2.6	0.99	<0.0001	4.5 (0.87)	—
Imazapyr	Rafalín	100.0	5.4	3.4	0.99	<0.0001	176.6 (14.5)	25.6
	Gazul	100.0	3.2	3.2	0.99	<0.0001	6.9 (0.64)	—
	Antioñín	100.0	4.9	3.1	0.99	<0.0001	80.7 (6.2)	10.6
	Simeto	100.0	3.6	3.7	0.99	<0.0001	7.6 (0.81)	—
Imazaquin	Rafalín	100.0	5.9	4.6	1.00	<0.0001	88.6 (5.7)	36.9
	Gazul	99.9	2.3	2.1	0.99	0.0002	2.4 (0.23)	—
	Antioñín	99.0	5.9	5.2	0.99	<0.0001	59.9 (4.3)	28.5
	Simeto	100.2	1.5	1.6	0.99	<0.0001	2.1 (0.16)	—
Other ALS-inhibiting families								
Tribenuron methyl (SU)	Rafalín	99.4	0.9	1.5	0.98	<0.0001	2.4 (0.11)	0.8
	Gazul	100.0	1.8	1.1	0.96	0.0066	2.9 (0.22)	—
	Antioñín	99.7	0.8	1.3	0.99	<0.0001	2.7 (0.31)	0.9
	Simeto	100.0	1.1	1.1	0.98	<0.0001	2.8 (0.14)	—
Floraslam (TP)	Rafalín	100.1	2.0	1.1	0.96	<0.0001	1.3 (0.23)	1.4
	Gazul	96.5	1.7	1.6	0.99	<0.0001	0.9 (0.14)	—
	Antioñín	100.0	2.1	1.3	0.98	0.0005	1.2 (0.17)	1.5
	Simeto	99.7	2.3	1.1	0.99	<0.0001	0.8 (0.11)	—
Bispyribac sodium (PTB)	Rafalín	96.0	2.5	4.5	0.99	<0.0001	4.7 (0.86)	1.1
	Gazul	93.6	1.9	3.3	0.98	0.0011	4.4 (0.41)	—
	Antioñín	94.0	2.4	4.4	0.98	0.0176	4.7 (0.62)	1.4
	Simeto	96.4	1.4	1.9	0.98	0.0072	3.3 (0.75)	—
Flucarbazone (SCT)	Rafalín	97.6	1.8	1.6	0.99	0.0004	2.3 (0.20)	0.8
	Gazul	98.1	1.1	1.9	0.98	0.0028	3.0 (0.45)	—
	Antioñín	96.7	1.3	1.7	0.99	0.0010	2.8 (0.32)	0.9
	Simeto	98.6	1.6	1.7	0.99	0.0004	2.9 (0.27)	—

Table 2. Parameters of the sigmoidal equation used to estimate the concentration (μM) of ALS-inhibiting herbicides needed to inhibit the ALS activity by 50% (I_{50}) in imazamox-susceptible and imazamox-resistant soft (*Triticum aestivum*) and durum (*Triticum durum*) wheat varieties. c = lower limit, d = upper limit, b = Hill's slope, R^2 aj = 1 - (sums of squares of the regression/corrected total sums of squares). RF = Resistance factor = $I_{50}R/I_{50}S$. CI values are the 95% confidence intervals (n = 3). SU = Sulfonylureas. PTB = Pyrimidinylthiobenzoates. SCT = Sulfonylaminocarbonyl triazolinone. TP = Triazopyrimidines.

	650	660
	--- --- --- ---	
<i>Imi1</i>	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	
AY210407	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	
Gazul (S)	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	
Rafalín (R)	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	
Simeto (S)	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	
Antioñín (R)	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	
<i>Imi2</i>	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	
AY210408	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	
Gazul (S)	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	
Rafalín (R)	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	
Simeto (S)	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	
Antioñín (R)	PHQEHVLPMPISGGAFKDMIMEGD	

Figure 3. Partial alignment of amino acid sequences for the *imi1*-ALS and *imi2*-ALS genes of the imazamox-susceptible and imazamox-resistant cultivars of the different soft (*Triticum aestivum*) and durum (*Triticum durum*) wheat varieties. Colored letters indicate the Ser-653 position corresponding to the point mutation associated with the conferring of imazamox resistance. Red letters indicate a change at the 653 position from AAC (serine = S) to AGC (asparagine = N) in the consensus nucleotide sequence.

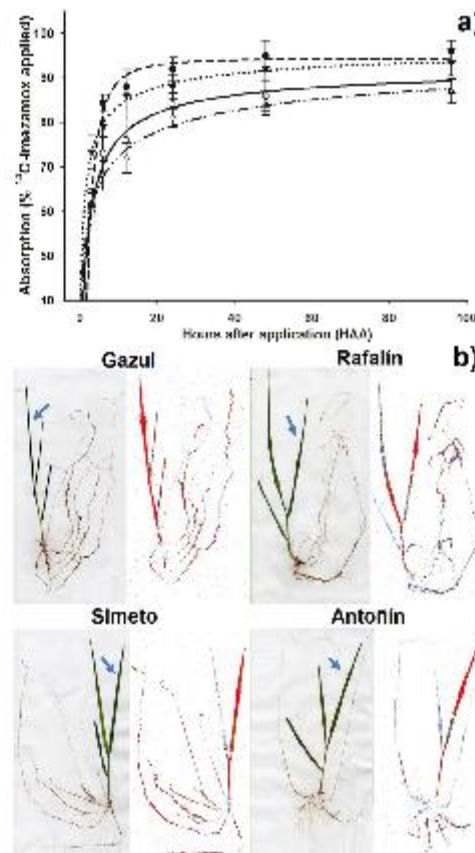


Figure 4. ^{14}C -imazamox absorption and translocation in wheat imazamox-susceptible and imazamox-resistant cultivars of the different soft (*Triticum aestivum*) and durum (*Triticum durum*) wheat varieties. (a) ^{14}C -imazamox absorption in the imazamox-susceptible and imazamox-resistant wheat plants. Vertical bars \pm standard error ($n = 5$). (b) Digital images and autoradiograph images of ^{14}C -imazamox translocation in imazamox-susceptible and imazamox-resistant wheat plants at 96 HAA. The highest concentration of ^{14}C -imazamox is highlighted in red. Arrows indicate the treated leaf.

A Phosphor Imager was used to confirm the previous results. At 96 HAA, the R-cultivar plants translocated smaller amounts of ^{14}C -imazamox from the treated leaf to the roots than S-cultivar plants. This finding shows that the ^{14}C -imazamox translocation could have contributed to the resistance of the R-cultivars (Fig. 4b).

Imazamox metabolism. In this study, the R-cultivar plants (Rafalín and Antoñín) presented rapid imazamox metabolism to hydroxylated imazamox (imazamox-OH) and a glucose conjugate (imazamox-glucose), which were metabolites that were not found in the S-cultivars (Gazul and Simeto). In taking into account that these metabolites come from imazamox, we considered the sum of all of them to be 100%, and we calculated the imazamox percentage that was metabolized in the leaves and roots. The R-cultivars had a high metabolite content at 96 HAA compared to the S-cultivars. In the case of the Rafalín and Antoñín cultivars, over 90% corresponded to imazamox metabolites, while the Gazul and Simeto cultivars did not metabolize this herbicide. It should be noted that the Antoñín cultivar presented higher contents of the glycosylated metabolite ($84.1 \mu\text{g g}^{-1}$ in leaves and $47.6 \mu\text{g g}^{-1}$ in roots) compared to the Rafalín cultivar ($50.4 \mu\text{g g}^{-1}$ in the leaves and $29.1 \mu\text{g g}^{-1}$ in the roots). Imazamox metabolism inhibition was also observed in R-cultivar plants that were treated with malathion. This finding suggests that cytochrome P450 monooxygenase (Cyt-P450) is involved in this detoxification mechanism (Fig. 5).

Cultivar	HAA*	Imazamox translocation (% from absorbed)		
		Treated leaf	Rest of shoots	Root
Wheat soft varieties				
Gazul (S)	3	95.1 ± 1.1 a	2.2 ± 0.7h	2.6 ± 1.3g
	6	88.8 ± 2.8 b	3.3 ± 2.5 h	7.9 ± 0.8f
	12	73.3 ± 2.5 d	12.8 ± 2.3f	13.9 ± 0.9 e
	24	65.6 ± 1.5 ef	14.5 ± 1.9 e	19.9 ± 1.8 c
	48	54.3 ± 3.9 g	22.9 ± 3.0 b	22.8 ± 2.1 b
Rafalín (R)	96	45.4 ± 2.5 h	30.0 ± 1.7 a	24.6 ± 1.8 a
	3	94.2 ± 1.5 a	3.3 ± 0.4h	2.6 ± 1.1g
	6	88.8 ± 3.3 b	2.9 ± 2.3 h	8.3 ± 1.2f
	12	79.7 ± 3.3 c	6.9 ± 1.1 g	13.3 ± 2.6 e
	24	70.2 ± 2.4 de	16.1 ± 1.3 d	13.8 ± 1.9 e
48	67.3 ± 4.1 e	18.6 ± 2.8 c	14.2 ± 3.0 e	
	96	61.9 ± 3.6 f	22.1 ± 1.4 b	16.1 ± 2.0 d
	Wheat durum varieties			
Simeto (S)	3	92.4 ± 1.0 A	3.6 ± 0.6 H	4.0 ± 0.5 H
	6	84.8 ± 2.9 B	9.6 ± 3.1 G	5.6 ± 0.5 G
	12	77.1 ± 1.5 C	9.0 ± 1.3 G	13.9 ± 0.3 D
	24	51.7 ± 0.7 G	20.9 ± 1.9 D	27.3 ± 2.4 A
	48	42.6 ± 1.2 H	31.8 ± 2.1 B	25.6 ± 2.2 B
Antioñín (R)	96	38.0 ± 4.6 I	35.1 ± 1.7 A	26.9 ± 3.0 A/B
	3	94.5 ± 1.7 A	2.2 ± 0.1 H	3.3 ± 1.6 H
	6	83.4 ± 1.5 B	8.3 ± 0.7 G	8.3 ± 1.2 F
	12	73.3 ± 3.1 C	15.5 ± 4.7 F	11.2 ± 1.6 E
	24	69.1 ± 3.1 D	18.5 ± 1.4 E	12.4 ± 2.1 D/E
48	63.9 ± 3.0 E	22.3 ± 2.4 D	13.9 ± 2.8 D	
	96	59.2 ± 1.4 F	19.2 ± 1.7 C	16.6 ± 2.1 C

Table 3. Translocation percentage of ^{14}C -imazamox in imazamox-susceptible and imazamox-resistant wheat plants of the durum (*Triticum durum*) and soft (*Triticum aestivum*) varieties. *HAA: Hours after application. Means with different letter within a column are statistically different at 95% probability determined by the Tukey's test. \pm Standard error of the mean (n = 5).

Discussion

Clearfield[®] wheat that is resistant to imazamox is a new and highly effective tool for weed control that has been developed in North America and in most Latin American countries. This study reports the first European case of two imazamox-resistant wheat cultivars, based on Clearfield[®] technology, which were obtained by the cross-breeding of Pantera *T. aestivum* Clearfield[®] and a local imazamox-susceptible cultivar (Gazul) and another *Triticum durum* Clearfield[®] obtained by the crossing of Simeto (local imazamox-susceptible *T. durum* cultivar) and a *Triticum durum* Clearfield[®].

Dose-response assays demonstrated the high susceptibility of the S-cultivars (Gazul and Simeto) at low doses, whereas the R-cultivars (Rafalín and Antoñín) presented a small reduction in fresh weight. The differences between the R-cultivars could be explained by the different biochemical, morphological, physiological and molecular traits^{21–23}. However, to achieve total growth reduction in a resistant plant, the grower needs to apply at least double the rate of herbicide as that of its corresponding GR₅₀²⁴. This rule implies that the Antoñín and Rafalín cultivars require imazamox doses that are 8 and 11 times, respectively, higher than the recommended field dose of 40 g i.a. ha⁻¹ of imazamox to produce total damage in the crop. This high level of resistance to the imazamox of wheat R-cultivars is enough to be a useful weed control tool, with advantages for farmers. The adequate use of herbicide-tolerant crops and the adoption of the associated agronomic practices may enhance farmland biodiversity and reduce the risk of weeds evolving herbicide resistance⁹.

Resistance to IMI herbicides is usually the result of a point mutation in the ALS gene that causes an amino acid substitution in the ALS enzyme^{10,25}. The high I₅₀ rate of the R-cultivars suggests that the resistance mechanism is related to the ALS enzyme in wheat cultivars^{9,16,20}. The similar specific activity of ALS between them also suggests that ALS overexpression is not involved as a resistance mechanism. Similar results were described in *Sinapis alba*²⁶ and *T. aestivum*²⁷, in which ALS overexpression was not involved as a resistance mechanism.

The higher GR₅₀ and I₅₀ values estimated for Rafalín were due to the fact that this cultivar presented a mutation at the Ser-653 position in the *imi1* and *imi2* genes, which are located on the long arms of chromosomes 6B and 6D, respectively. Consequently, this resistant cultivar has a higher imazamox resistance level than the Antoñín

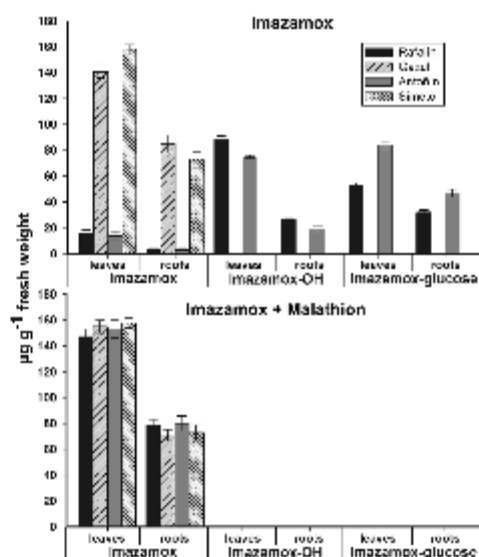


Figure 5. Imazamox metabolism of soft (*Triticum aestivum*) and durum (*Triticum durum*) wheat varieties treated at the field dose (40 g ai ha^{-1} imazamox). **A)** The total concentration of imazamox and its metabolites in leaf and root samples from imazamox-susceptible and imazamox-resistant cultivars of the different wheat varieties at 96 HAA as obtained by LC-DAD and LC-TOF/MS. Bars indicate the standard deviation of the mean ($n = 3$).

cultivar, and it only carried a single resistance gene (*imi2*). The R-wheat cultivars have satisfactorily acquired these alleles from their respective resistant parents, i.e., the *imi1* and *imi2* genes from the Pantera²⁰ cultivar were transferred to Rafalín, and *imi2* from *Tritordeum*²⁵ was transferred to the Antofín cultivar. The resistant allele *imi2*, common in Clearfield²⁶ crops, endows sufficient resistance level at recommended field rates to IMI herbicides²⁹. The resistance conferred by the ALS-resistant *imi1* gene resulted in an additive resistance level to that conferred by *imi2* gene. These mutations only confer resistance to IMI herbicides, but not cross-resistance to other ALS inhibitors⁶. The fitness cost associated to ALS-resistant alleles is small and easily detectable¹⁰. However, this fact can not generalize and the impact of each specific ALS gene mutation needs to be individually evaluated²⁹, taking into account the growing conditions and species¹⁰. In addition, the epistatic effects of multiple resistance alleles on plant fitness cost is yet unknown^{10,30}. Therefore, further studies are needed to determine the epistatic effect of ALS-resistant allele in *imi1* gene of cultivar Rafalín, on fitness cost and the possible yield drag.

The ALS isoform from the D genome, which corresponds to the *imi2* gene, presents more ALS activity compared to isoforms of the A and B genomes²¹. This finding explains why the *imi2* mutation is sufficient for making the Antofín cultivar resistant to imazamox. Our results are consistent with other studies that report a single and/or double mutation in the *imi1*- and *imi2*-ALS genes that confer resistance to IMI herbicides in wheat cultivars^{16,20,28,32}, and other Clearfield²⁶ crops such as rice³³, barley³⁴, sunflowers³⁵ and chickpeas^{32,35}. In addition, a mutation at the Ala122 position of the *imi2* gene that was identified in wheat improved the resistance to IMI herbicides¹².

The effectiveness of an herbicide depends on the retention of the product on the leaf³³, the foliar absorption of the active ingredient and finally its translocation to the site of action^{21,32}. Herbicide foliar retention is influenced by leaf morphological characteristics³⁶, and it is not a major mechanism that confers herbicide resistance^{23,37}. Our results suggest that the leaf morphology of wheat cultivars is not related to greater or lesser herbicide retention, as was demonstrated in other imazamox-resistant wheat cultivars^{9,20,27}.

Imazamox is absorbed and translocated very quickly. However, given that resistance to ALS inhibitor herbicides is generally associated with mutations in the ALS gene^{9–11}, the absorption and translocation are not usually studied, and information on these mechanisms in Clearfield²⁶ crops is scarce. We recorded high absorption rates between the S- and R-cultivars, confirming that this mechanism is not involved in the resistance of the latter. By contrast, the ¹⁴C-imazamox translocation results suggested that this parameter could play an important role in the resistance of the Rafalín and Antofín cultivars because they retained most of the herbicide in the treated leaf. However, the translocation differences were a physiological and metabolic response to the different sensitivities to imazamox between the S- and R-cultivars, because this differential translocation was neutralized with malathion. The lowest translocation observed in the R-cultivars can be explained by the fact that these cultivars metabolized imazamox, and the identified metabolites (imazamox-OH and imazamox-glucose) have limited mobility³⁸.

Therefore, the observations made during the absorption and translocation assays in the wheat R-cultivars not only showed the translocated ^{14}C -imazamox but also these ^{14}C -metabolites.

Clearfield® crops generally have an enhanced ability to metabolize IMI herbicides before they reach the target site³⁹. Imazamox metabolism was documented for the cultivar Clearfield® Pantera²⁰, and although there are no studies in *Triticum*, it is evident that the R-cultivars (Rafalín and Antoñín) acquired the ability to metabolize IMI herbicides from their R counterparts. The mechanism by which Clearfield® crops gain tolerance to IMI herbicides has not yet been fully characterized⁴⁰. In our study, malathion applications confirmed that Cyt-P450 enzymes play an important role in the imazamox detoxification of the R-cultivars into compounds that are harmless (imazamox-OH and imazamox-glucose) to the plants²². These enzymes are mediators of herbicide degradation that are involved in multiple herbicide resistance^{11,41,42}. Cyt-P450 enzymes are responsible for the hydroxylation of a methyl group on the imazamox molecule studies^{43,44}, followed by a glucosyl transferase catalysis producing a glucose conjugation⁴². This reaction occurs rapidly and is not reversible⁴¹. In addition, IMI herbicide metabolism not only has very little effect on the ALS, but the herbicide is also poorly translocated²⁰. However, it can not be attributed that the metabolism of imazamox was due solely to Cyt-P450 genes, because other secondary metabolism pathways can be involved in resistance to ALS-inhibiting herbicides, resulting in an accumulation of different non-target-site-resistance genes, each of them conferring a moderate level of resistance⁴¹.

Conclusions

The differential response to imazamox between R- and S-cultivars was primarily due to the number of resistance genes that carry each genotype (at target-site level), but it must also be attributed to the enhanced imazamox metabolism into non-toxic compounds (imazamox-OH and imazamox-glucose), which is mediated by the Cyt-P450 (non-target-site genes) and is responsible for altering the translocation patterns. These mechanisms confer high resistance to IMI herbicides in the cultivars Rafalín (*T. aestivum*) and Antoñín (*T. durum*), allowing them to survive at higher doses than the recommended field dose of imazamox (40 g ai ha⁻¹), being a great advantage for farmers in terms of weed management.

Material and Methods

Plant material. Two wheat cultivars (*T. aestivum* and *T. durum*) were used. For *T. aestivum* the cultivar Rafalín resistant to imazamox (R), and the cultivar Gazul as the susceptible one (S) were used. For *T. durum*, the R- and S-cultivars were Antoñín and Simeto, respectively. The cultivar Rafalín comes from the crossbreeding of Pantera Clearfield® (R) x Gazul (S) cultivars. Pantera was previously characterized by this research group²⁰, and it has two mutations (*imi1* and *imi2*) that confer resistance to imazamox. The resistant biotype of *T. durum* (Antoñín) comes from the crossing of Simeto (S) x *Triticum*, which presents the mutation *imi2*¹⁵. The *Triticum*, likewise, comes from the crossing of *Triticum turgidum* x *Hordeum chilense*. The obtaining of the Antoñín cultivar and *Triticum* has been improving thanks to the work of the Plant Breeding group of Dr. Antonio P. Martín from the Institute for Sustainable Agriculture, Spanish National Research Council, Córdoba, Spain (IAS-CSIC).

The R-cultivars were selected survived a screening at the dose of 40 g ai ha⁻¹ of imazamox (Pulsar® 40, imazamox 4%), and because they conserved the traits of their susceptible parents, Gazul and Simeto.

Growth conditions. Seeds were sown in Petri dishes with two layers of filter paper moistened with distilled water. They were kept at 4 °C in the dark during 48 h. After this period, the seeds were transferred to a growth chamber until germination, with a temperature regime of 27/14 °C day/night with a photoperiod of 14/10 h, respectively. The seedlings were placed in pots (1 L) containing a mixture of peat and sand (1:1) as substrate, and taken to the greenhouse, where the plants grew at 25–28/12–14 °C day/night with 16 h of photoperiod. The natural light was supplemented by 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux density delivered by incandescent and fluorescent lights. Once the plants reached a growth state corresponding to 3–4 true leaves, the treatments were performed.

Foliar herbicide retention. Foliar herbicide retention assays were performed following the method adapted by Jiménez *et al.*²⁷. Plants were treated with a solution containing 40 g ai ha⁻¹ of imazamox + 1.25 L ha⁻¹ of adjuvant Dash (34.5% w/v methyl oleate/methyl palmitate) + 100 mg L⁻¹ Na-fluorescein in the same treatment chamber used in dose-response assays. Na-fluorescein was used as a labeling reagent to determine the amount of herbicide solution retained. Once the herbicide solution from the leaf (20–25 min) was dry, the plants were cut at ground level and washed individually in Erlenmeyer's containing 50 mL of NaOH 5 mM shaking them vigorously for 30 seconds. The washing solution was recovered in glass flasks and the fluorescein absorbance was immediately measured at 490_{nm}/510_{nm} (Hitachi F-2500 spectrofluorimeter). The cut tissues were packed in cellulose envelopes and dried in an oven at 80 °C for 72 h. Ten plants of each cultivar were used in a completely random design. Retention was expressed as μL of imazamox solution per g of dry matter.

Imazamox dose-response. Wheat plants were treated with imazamox at the following doses: 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 40 g ai ha⁻¹ for S-cultivars, and 0, 40, 80, 120, 160 and 240 g ai ha⁻¹ for R-cultivars. Dash adjuvant was added at dose of 1.25 L ha⁻¹ in all treatments. Herbicide applications were conducted using a treatment chamber (Devries Manufacturing, Hollandale, MN, USA) equipped with an 8002EVS flat fan nozzle (TeeJet, Spraying System Spain, S.L., Madrid, Spain) calibrated at 200 kPa and 250 L ha⁻¹ of application volume. The experiment was repeated twice in a completely randomized design with 10 replicates per dose, evaluating the fresh weight reduction of the plants at 30 days after application (DAA). Data were expressed as percentage fresh weight reduction with respect to the untreated control plants.

ALS enzyme activity. ALS activity was determined following the methodology used by Hatami *et al.*⁴⁴ with slight modifications. Samples of three grams of leaf tissue were taken and immediately frozen in liquid N₂. Then, the samples were macerated in a mortar using 5 mg of polyvinylpyrrolidone (PVPP). An extraction buffer composed of 1 M K-phosphate buffer solution (pH 7.5), 10 mM sodium pyruvate, 5 mM MgCl₂, 50 mM thiamine pyrophosphate, 100 μM flavin adenine dinucleotide (FAD), 12 mM dithiothreitol and glycerol (1:9 v/v) was added. The solution was agitated for 10 min at 4 °C. The homogenate was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged (20,000 rpm for 20 min). The supernatant containing a crude ALS enzyme extract was immediately used for the enzyme assays. To assay the ALS activity, 90 μL of enzyme extract was added to 110 μL of freshly prepared assay buffer (0.08 M K-phosphate buffer solution (pH 7.5), 0.5 M sodium pyruvate, 0.1 M MgCl₂, 0.5 mM thiamine pyrophosphate, and 1 μM FAD). Then, increasing concentrations (0, 0.1, 1, 5, 10, 50, 100 and 1000 μM) of ALS inhibiting herbicides were added. The herbicides of technical grade were imazamox, imazapyr, imazaquin, tribenuron methyl, bispyribac sodium, flucarbazone and florasulam. Standard compounds used with 96.5–98% purity were provided by Sigma-Aldrich, Spain. The mixture was incubated for 60 min at 37 °C. The reaction was stopped after the addition of 50 μL of H₂SO₄ and incubated at 60 °C for 15 min to decarboxylate acetolactate to acetoin. Finally, 250 μL of a freshly prepared solution of creatine in water (5 g L⁻¹) and 250 μL of a solution of naphthol in sodium hydroxide (50 g L⁻¹ NaOH 5 M) was added. It was again incubated at 60 °C for 15 min to facilitate decarboxylation of acetolactate to acetoin. Absorbance of acetoin was measured with a spectrophotometer (Beckman DU-640, Fullerton, CA, USA) at 520 nm. The total content of ALS in the raw extract was measured using the colorimetric method using the commercial kit-protocol No. P5656 (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions at 595 nm. The background was subtracted using control tubes. Three replicates per cultivar were made, each with extract from the mixture of the three plants.

ALS sequencing. Young leaf samples (±100 mg) from four wheat cultivars were taken and stored at -20 °C, until use. For DNA extraction, the Speed tools kit DNA Extraction Kit Cat Plant (Biotools B & M Labs. S.A) were used. The primer pair AHAS21Fwd/AHAS26Rev, designed by Pozniak *et al.*⁴⁵ to amplify a 617 bp-length fragment was observed. A polymerase chain reaction (PCR) reaction was set up with Certamp complex enzyme mix (Biotools B&M Labs, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. PCR products (5 μL) were digested with the restriction enzyme *Msp* I (Invitrogen, CA, USA) to try to identify the three expected ALS alleles (from genomes A, B or D) of the catalytic subunit present in wheat varieties⁴⁶. Both PCR and digestion products were resolved on 1% agarose gels and viewed under UV light. Ten PCR products of each allele and each cultivar were sequenced by Sanger technology. The assembly of the sequences was carried out by SeqMan Pro (Version 11, DNASTAR; Madison, WI, USA) and Geneious (Version 8.1.8, Biomatters Ltd, and Auckland, New Zealand) software's. ALS sequences of the wheat accessions *imi1*-AY210407, *imi2*-AY210408 and *imi3*-AY273827 from GenBank, were included in the alignment.

¹⁴C-imazamox absorption-translocation. Wheat plants were treated with an herbicide solution prepared with commercial product mixed with ¹⁴C-imazamox. The final concentration corresponded to 40 g ai ha⁻¹ of imazamox + 1.25 L ha⁻¹ of Dash into 250 L ha⁻¹ with a specific activity of 834 kBq μL⁻¹. A drop (1 μL/plant) of this solution was applied to the surface of the second expanded leaf using a micropipette (Lab Mate HTL). The treated plants were carefully removed from the pot and washed at 3, 6, 12, 24, 48 and 96 HAA. ¹⁴C-imazamox unabsorbed from a treated leaf was washed with 3 mL of water-acetone (9:1 v/v) solution. Plants were separated into treated leaf, remainder of plant, and roots. The rinsing solution was mixed with 2 mL of scintillation fluid (Ultima GoldTM; Perkin-Elmer, Packard Bioscience BV) and analyzed by the LSS detector (scintillation counter, Beckman LS 6500). Samples of the plants were stored individually in combustion cones (Combustion-Cone, Flexible; Perkin-Elmer, Packard Bioscience BV), dried in an oven at 60 °C for 72 h, and then combusted using a biological oxidizer (Packard Tri Carb 307, Packard Instruments, Meriden, CT, USA). The CO₂ produced in the combustion was retained in 18 mL of a mixture of Carbo-Sorb E and Permafluor (1:1 v/v) (Perkin-Elmer, BV Bioscience Packard) in scintillation vials. Radioactivity was quantified by LSS, and the percentage of absorbed herbicide was expressed as [KBq tissue oxidized by combustion / (KBq oxidized by combusting + KBq tissue obtained from washing)] × 100. Five plants of each cultivar were used in a completely random design.

Simultaneously, whole plants treated with ¹⁴C-imazamox and rinsed with water: acetone (9:1 v/v), were fixed on filter paper (25 × 12.5 cm) and dried at room temperature. Finally, they were placed for 4 h on a phosphor film to visualize the ¹⁴C-imazamox by a phosphor imager (Cyclone, Perkin-Elmer, and Packard Bioscience BV). Three plants of each cultivar were used at each evaluation time.

Imazamox metabolism. The methodology described by Rojano-Delgado *et al.*⁴⁶ was followed. Ten plants of each wheat cultivar were treated with imazamox at 40 g ai ha⁻¹ (field dose) as in the dose-response assays. Jointly, a group of 10 plants of each cultivar were treated with Malathion (1000 g ai ha⁻¹) 1 h before imazamox application, to evaluate if the Cyt-P450 was involved in the imazamox metabolism. A group of plants was remained as control. Those plants treated with herbicide and the controls were cut at 96 HAA and were washed with 60 mL of distilled water to remove the imazamox and soil residues on the leaf surface and finally stored at -40 °C until use. The samples were macerated in a porcelain mortar to a fine powder using liquid nitrogen. Next, 500 mg of each sample was mixed with 10 mL of methanol:water (9:1 v/v), and the metabolites were extracted using ultrasound at 70-W ultrasonication power for 10 min (duty cycle 0.7 s s⁻¹). Supernatant was separated by centrifugation (15 min at 15000 rpm), and evaporated to dryness under an airstream. The solid residue of this fraction was reconstituted in 500 μL of methanol:water (9:1 v/v), and filtered through a nylon filter syringe (45 μm pore size and 13 mm i.d.; Millipore, Ireland) before chromatographic analysis.

For the determination of imazamox and its metabolites in extracts from plants, a liquid chromatography-diode array detector was employed. A hydrophilic interaction liquid chromatography column C18 (20 cm × 4.6 mm, 3

µm particle size) was used for the separation of the target compounds. Fifty µL of the reconstituted phase was injected into the liquid chromatography with 1% acetic acid solution as mobile phase A, and 100% methanol as mobile phase B. The elution program started with 5% mobile phase B and followed the linear gradient: step 1: 5 to 20% methanol for 10 min; step 2: 20 to 80% methanol for 10 min; step 3: 80 to 100% methanol for 5 min; and step 4: 100 to 5% methanol for 10 min. The constant flow rate and column temperature were 1 mL min⁻¹ at 40 °C. Chromatographic grade and liquid chromatography–mass spectrometer grade solvents were used for liquid chromatography–diode array detector and liquid chromatography–time-of-flight/mass spectrometer analysis, respectively.

The analyses were performed in an Agilent 1200 Series LC system interfaced to an Agilent 6540 UHD Accurate-Mass liquid chromatography–time-of-flight/mass spectrometer detector (Palo Alto, USA), equipped with an Agilent Jet Stream Technology electrospray ion source operating in the positive ionization mode. The separation conditions were identical to those for the liquid chromatography–diode array detector determination, except for the use of the respective liquid chromatography–time-of-flight/mass spectrometer grade solvents.

After analysis, imazamox and metabolites were determined by the liquid chromatography–diode array detector analysis (measurement wavelength, 240 nm). A 15 Gold HPLC System from Beckman Coulter (Fullerton, USA) equipped with a 26 System Gold Diode Array detector (wavelength range 190–600 nm) was used in this case. Chromatographic peaks were assigned according to retention times using as a reference the imazamox peak identified by spiking extracts with the commercial standard. Quantification of imazamox metabolites was based on the calibration model for imazamox, and the results were expressed as µg of analytic g⁻¹ fresh weight. Three replications per sample were analyzed.

Statistical analysis. The percentage data of fresh weight reduction and ALS enzyme activity were submitted to a non-linear regression analysis. The dose of imazamox needed to reduce the weight of a population (GR₅₀) and to inhibit ALS activity (I₅₀) by 50% was calculated. The *drc* statistical package in the program R version 3.2.5 was used to conduct the following log-logistic model of four parameters⁴⁶: $Y = c + \frac{(d - c)}{1 + (x/g)^b}$, where *Y* is the percentage of fresh weight reduction with respect to the control, *c* and *d* are coefficients corresponding to the upper and lower asymptotic limits, *b* is the Hill slope, *g* is the imazamox dose (GR₅₀ or I₅₀) at the mean point of inflexion between the upper and lower asymptote and *x* (independent variable) corresponds to the glyphosate dose. The data were plotted using SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., USA). Resistance factor was calculated as $RF = GR_{50} \text{ or } I_{50} (R) / GR_{50} \text{ or } I_{50} (S)$.

The data obtained in the spray retention, ¹⁴C-imazamox absorption and translocation, and imazamox metabolism were subjected to ANOVA. For each analysis, assumptions such as equality of variance and normal distribution were evaluated. When required, the Tukey HSD test at 5% probability was used to separate means. A statistical analysis was performed using Statistix software (version 9.0) from Analytical Software (USA).

References

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO cereal supply and demand brief. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csd/en/> (Date of access: 27/06/2017) (2017).
- Shennan, C. Biotic interactions, ecological knowledge and agriculture. *Philos. Trans. R. Soc. B* **363**, 717–739 (2008).
- Munst, E. et al. Integration of weed control methods with seed rates for improving wheat yield. *Weed Sci. Res.* **20**, 155–165 (2014).
- Troyer, J. R. In the beginning: the multiple discovery of the first hormone herbicides. *Weed Sci.* **49**, 290–297 (2001).
- Green, J. M. The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. *Pest Manag. Sci.* [doi:https://doi.org/10.1002/ps.4162](https://doi.org/10.1002/ps.4162) (2017).
- Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K. & Shaner, D. L. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.* **61**, 246–257 (2005).
- BASF. The Clearfield Plus production system for wheat. <http://agproducts.basf.us/products/clearfield-plus-wheat.html> (Date of access: 27/06/2017) (2014).
- Lamichhane, J. R. et al. Integrated weed management systems with herbicide-tolerant crops in the European Union: lessons learnt from home and abroad. *Crit. Rev. Biotechnol.* **37**, 459–475 (2017).
- Rojano-Delgado, A. M., Priego-Capote, F., Laque de Castro, M. D. & De Prado, R. Mechanism of imazamox resistance of the Clearfield® wheat cultivar for better weed control. *Agron. Sustain. Dev.* **35**, 639–648 (2015).
- Yu, Q. & Powles, S. B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Manag. Sci.* **70**, 1340–1350 (2014).
- Yuan, J. S., Tranel, P. J. & Stewart, C. N. J. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Sci.* **12**, 6–13 (2007).
- Li, D., Barclay, L., Jose, K., Stefanova, K. & Appels, R. A mutation at the Ala122 position of acetohydroxyacid synthase (AHAS) located on chromosome 6D of wheat: improved resistance to imidazolinone and a faster assay for marker assisted selection. *Mol. Breeding* **22**, 217–225 (2008).
- Pozniak, C. J. et al. Physiological and molecular characterization of mutation-derived imidazolinone resistance in spring wheat. *Crop Sci.* **44**, 1434–1443 (2004).
- Ozuna, C. V. et al. Diversification of the celiac disease α-gliadin complex in wheat: a 33-mer peptide with six overlapping epitopes, evolved following polyploidization. *Plant J.* **82**, 794–805 (2015).
- Rodríguez-Suárez, C. et al. Selection and molecular characterization of imidazolinone resistant mutation-derived lines of *Triticum aestivum* HT621. *Mol. Breeding* **23**, 565–572 (2009).
- Pozniak, C. J. & Hucl, P. J. Genetic analysis of imidazolinone resistance in mutation-derived lines of common wheat. *Crop Sci.* **44**, 23–30 (2004).
- Klümper, W. & Qaim, M. A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. *PLoS One* **9**, e111629, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111629> (2014).
- Szénási, A., Pálfi, Z., Zalat, M., Schmitz, H. J. & Balog, A. Short-term effects of different genetically modified maize varieties on arthropod food web properties: An experimental field assessment. *Sci. Rep.* **4**, 5315, <https://doi.org/10.1038/srep05315> (2014).
- Laursen, L. Will Europe lose GM wheat for gluten sufferers? *Nat. Biotechnol.* **34**, 369–71 (2016).
- Jimenez, F. et al. Physiological, biochemical and molecular characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in wheat. *Physiol. Plant.* **158**, 2–10 (2016).
- Menendez, J., Rojano-Delgado, A. & De Prado, R. 2014. Differences in herbicide uptake, translocation, and distribution as sources of herbicide resistance in weeds in *Retention, uptake, and translocation of agrochemicals in plants* (eds Myung, K., Saichvut, N.M. & Kingston C. K.) 141–157 (ACS Publications, 2014).

22. Rojano-Delgado, A., Menéndez, J. & De Prado, R. 2014. Absorption and penetration of herbicide viewed in metabolism studies: Case of glufosinate and imazamox in wheat in *Retention, uptake, and translocation of agrochemical in plants* (eds Myung, K., Satchivi, N.M. & Kingston C. K.) 159–165 (ACS Publications, 2014).
23. Yao, C., Myung, K., Wang, N. & Jhosen, A. Spray retention of crop protection agrochemicals on the plant surface in *Retention, uptake, and translocation of agrochemical in plants* (eds Myung, K., Satchivi, N.M. & Kingston C. K.) 1–22 (ACS Publications, 2014).
24. Alcántara-de la Cruz, R. et al. Target and non-target site mechanisms developed by glyphosate-resistant hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) populations from Mexico. *Front. Plant Sci.* 7, 1492, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01492> (2016).
25. Thompson, C. & Tar'an, B. Genetic characterization of the acetohydroxyacid synthase (AHAS) gene responsible for resistance to imidazolinone in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 127, 1583–1591 (2014).
26. Cruz-Hipólito, H. E. et al. Resistance mechanism to tribenuron-methyl in white mustard (*Stenopis alba*) from southern Spain. *Weed Sci.* 61, 341–347 (2013).
27. Jiménez, F., Fernández, P., Rojano-Delgado, A. M., Alcántara, R. & De Prado, R. Resistance to imazamox in Clearfield soft wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Prot.* 78, 15–19 (2015).
28. Pérez-Jones, A., Martins, B. A. B. & Mallory-Smith, C. A. Hybridization in a commercial production field between imidazolinone-resistant winter wheat and jointed goatgrass (*Aeluropus cylindrica*) results in pollen-mediated gene flow of *hmt1*. *Weed Sci.* 58, 395–401 (2010).
29. Vila-Aluh, M. M., Neve, P. & Powles, S. B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytol.* 184, 51–767 (2009).
30. Goldringer, I., Brabant, P. & Gallais, A. Estimation of additive and epistatic genetic variances for agronomic traits in a population of doubled-haploid lines of wheat. *Heredity* 79, 60–71 (1997).
31. Hanson, B. D., Shaner, D. L., Westra, P. & Nissen, S. J. Response of selected hard red wheat lines to imazamox as affected by number and location of resistance genes, parental background, and growth habit. *Crop Sci.* 46, 1206–1211 (2006).
32. Anderson, J. A., Matthies, L. & Hegstad, J. Resistance to an imidazolinone herbicide is conferred by a gene on chromosome 6DL in the wheat line cv 9804. *Weed Sci.* 52, 83–90 (2004).
33. Scarabel, L., Cenghialta, C., Manuelli, D. & Sattin, M. Monitoring and management of imidazolinone-resistant red rice (*Oryza sativa* L., var. *sativa*) in Clearfield® Italian paddy rice. *Agronomy* 2, 371–383 (2012).
34. Lee, H. et al. Single nucleotide mutation in the barley acetohydroxy acid synthase (AHAS) gene confers resistance to imidazolinone herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 8909–8913 (2011).
35. Kolkman, J. M. et al. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 109, 1147–1159 (2004).
36. Alcántara-de la Cruz, R., Barro, F., Domínguez-Valenzuela, J. A. & De Prado, R. Physiological, morphological and biochemical studies of glyphosate resistance in Mexican Cologan (*Colgania bruceana* (Benth.) DC.). *Plant Physiol. Biochem.* 98, 72–80 (2016).
37. Alcántara-de la Cruz, R. et al. First resistance mechanisms characterization in glyphosate-resistant *Leptochloa virgata*. *Front. Plant Sci.* 7, 1742, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01742> (2016).
38. Pester, T. A., Nissen, S. J. & Westra, P. Absorption, translocation, and metabolism of imazamox in jointed goatgrass and feral rye. *Weed Sci.* 49, 607–612 (2001).
39. BASF Clearfield Technologies: Imidazolinone herbicides and the effects of low temperature stresses and/or frost. http://www.cropcare.com.au/Assets/525/2/TNClearfield-2013imidazolinoneRDUupdate_Web.pdf (Date of access: 27/06/2017) (2013).
40. Manabe, Y., Tinker, N., Colville, A. & Miki, B. CSRI, the sole target of imidazolinone herbicide in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 48, 1340–1358 (2007).
41. Gaines, T. A. et al. RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. *Plant J.* 78, 865–876 (2014).
42. Yu, Q. & Powles, S. B. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: A threat to herbicide sustainability and global crop production. *Plant Physiol.* 166, 1106–1118 (2014).
43. Duhoux, A. & Delye, C. Reference genes to study herbicide stress response in *Lolium* sp.: Up-regulation of P450 genes in plants resistant to acetolactate synthase inhibitors. *PLoS ONE* 8, e63576, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063576> (2013).
44. Hatami, Z. M. et al. Multiple mechanisms increase levels of resistance in *Rapistrum rugosum* to ALS herbicides. *Front. Plant Sci.* 7, 169, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00169> (2016).
45. Rojano-Delgado, A., Priego-Capote, F., De Prado, R. & Castro, M. D. L. Ultrasound-assisted extraction with LC-TOF/MS identification and LC-UV determination of imazamox and its metabolites in leaves of wheat plants. *Phytochem. Anal.* 25, 357–363 (2014).
46. Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. & Gerhard, D. Dose-response analysis using R. *PLoS One* 10, e0146021, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021> (2015).

Acknowledgements

This study was supported by Project AGL 2016-78944-R (Spain) and BASF International (Frankfurt, Germany) for delivery ¹⁴C-imazamox. The authors would like to thank Rafael Roldán for his assistance with the experiments, and Dr. Antonio P. Martín (CSIC-Córdoba, Spain) for their insightful and important comments.


Author Contributions

R.P.: Idea and designed the experiments. R.D.-M., R.A.-C., A.M.R.-D. and P.F.-M.: Performed the research. R.D.-M., R.A.-C., A.M.R.-D. and P.F.-M.: Analyzed the results and written the draft of this manuscript. All authors corrected and approved the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Pest Management Science



Stacked traits conferring multiple resistance to imazamox and glufosinate in soft wheat

Journal:	<i>Pest Management Science</i>
Manuscript ID:	PM-18-0186
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	05-Mar-2018
Complete List of Authors:	Domínguez-Mendez, Rafael; University of Cordoba, Agricultural Chemistry and Edaphology Alcántara-de la Cruz, Ricardo; Universidade Federal de Vicos, Departamento de Entomologia Rojano-Delgado, Maria; University of Cordoba, Agricultural Chemistry and Edaphology Silveira, Hellen; Universidade Federal de Vicos, Departamento de Fitotecnia Partuqal, João; Instituto Politecnico de Beja Escola Superior Agraria, Department of Biosciences Cruz-Hipólito, Huqo; Bayer CropScience, Bayer CropScience De Prado, Rafael; University of Cordoba, Department of Agricultural Chemistry and Edaphology
Key Words:	acetolactate synthase, glutamine synthase, herbicide resistance crops, N-acetyl-glufosinate, phosphinothricin acetyl transferase, <i>Triticum aestivum</i>

SCHOLARONE™
Manuscripts

<http://mc.manuscriptcentral.com/pm-wiley>

1
2
3 1 **Run title:** Imazamox- and glufosinate-resistance in wheat

4
5 2 **Stacked traits conferring multiple resistance to imazamox and**
6
7 3 **glufosinate in soft wheat**
8
9

10 4 Rafael Domínguez-Mendez¹, Ricardo Alcántara-de la Cruz^{2*}, Antonia M. Rojano-Delgado¹,
11
12 5 Hellen Martins da Silveira³, João Portugal⁴, Hugo E. Cruz-Hipólito⁵, Rafael De Prado¹
13

14 6 ¹ Department of Agricultural Chemistry and Edaphology, University of Córdoba, 14071
15
16 7 Córdoba, Spain.

17 8 ² Departamento de Entomologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa,
18
19 9 Brasil.

20 10 ³Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Brasil.

21 11 ⁴Department of Biosciences, Polytechnic Institute of Beja, 7800-295 Beja, Portugal.

22 12 ⁵ Bayer CropScience Mexico, 11520 Mexico City, Mexico.

23
24 13
25 14 *Corresponding author: ricardo.la@ufv.br (RAC)
26
27 15

ABSTRACT

BACKGROUND: Crossing soft wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars resistant to imazamox and glufosinate by conventional methods resulted in two (Rados and Helter) lines resistant to both herbicides. The stacked traits conferring this dual herbicide resistance in the Rados and Helter lines, compared with a susceptible (S) cultivar, were characterized.

RESULTS: Rados and Helter were between 14.5 to 40.1 times more resistant (R) to both herbicides than the S cultivar. The basal activities of acetolactate synthase (ALS) and glutamine synthase (GS) were similar between R and S plants. Rados and Helter lines were 16.4 and 24.7 times more resistant to imazamox at the target-site level than the S cultivar. The GS enzymes of R and S wheat plants were equally sensitive to glufosinate. However, the R plants presented lower ammonia accumulation, due to the rapid acetylation of the glufosinate to N-acetyl glufosinate by the phosphinothricin acetyl transferase (PAT) enzyme. The similar absorption and translocation patterns for ¹⁴C-imazamox and ¹⁴C-glufosinate showed that these mechanisms were not involved in the multiple resistance.

CONCLUSION: The stacked traits conferring the dual herbicide resistance in these R wheat lines were alterations in their ALS genes, for imazamox, and a rapid deactivation of glufosinate by N-acetyl-glufosinate. These R lines provide potential tools for weed management in wheat production via herbicide rotation.

Keywords: acetolactate synthase; glutamine synthase; herbicide resistance crops; N-acetyl-glufosinate; phosphinothricin acetyl transferase; *Triticum aestivum*

INTRODUCTION

Wheat (*Triticum* spp.) is a crop of great economic importance. Current production is estimated at more than 720 million tons per year worldwide,¹ intended for the production of human and animal food. Weeds are among the major biotic factors for crop production competing for soil, water, light and nutrients.² In wheat, they can mean a reduction in yield of up to 50%.³

Plant transformation methods (biobalistic, electroporation, microinjection, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated cell transformation, etc.), conventional plant breeding (plant selection, outcrossing with elite cultivars, mutagenesis, etc.), and combinations thereof events have delivered herbicide resistant (HR) crops that offer significant advantages for weed control.^{4,5} These crops were introduced in the mid 90's and adopted quickly by farmers. However, the use of HR crops resistant to a single mode of action and their improper use, has caused the rapid expansion of a wide range of herbicide resistant weeds, decreasing the value of this technology.⁶ The judicious adoption of HR crops and their associated agronomic practices, may contribute to maintaining the biodiversity of agricultural lands and reduce the risk of weeds evolving herbicide resistance.⁷ To improve this technology, HR crops with multiple or stacked traits are being developed.^{8,9} (Shaner and Beckie 2014; Gressel et al. 2017). Meanwhile efforts are being made to implement new weed management strategies.¹⁰

Imazamox and ammonium glufosinate (glufosinate) are two of the most effective post-emergence herbicides. Imazamox is a systemic broad-spectrum herbicide that inhibits the enzyme acetolactate synthase (ALS), causing undernutrition and disrupting the synthesis of valine, leucine and isoleucine.¹¹ Glufosinate is a contact and non-selective herbicide that is minimally translocated, requiring complete coverage to ensure control of weeds.¹² This herbicide inhibits the synthesis of glutamine synthase (GS; EC 6.3.1.2), causing a rapid accumulation of ammonia within the plant damaging chloroplast and photosynthesis structures.¹³

Crop varieties resistant to imidazolinone herbicides (ALS inhibitors group) are based on non-transgenic Clearfield[®] technology developed by BASF (Badische Anilin- und Soda-Fabrik). Its resistance is attributed to the Ser653Asn mutation in ALS homologous genes located in the chromosomes 6B and 6D of wheat.¹⁴⁻¹⁶ The glufosinate resistance in crops is due to the *bar* or *pat* genes, isolated from *Streptomyces viridochromogenes* and *S. hygroscopicus*, respectively. These genes are 87% identical at the nucleotide sequence level, and both encode phosphinothricin acetyl transferase (PAT; EC 2.3.1.183),¹³ responsible for deactivating the glufosinate to N-acetyl-glufosinate.¹⁷ However, other resistance mechanisms should not be

ruled out, such as foliar morphological alterations related to herbicide retention, decreased absorption and translocation, and detoxification of the herbicide by the plant.¹¹

Crossing soft wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars resistant to imazamox and glufosinate by conventional methods resulted in lines resistant to both herbicides. The objectives were: 1) to evaluate the degree of resistance to imazamox and glufosinate in two new resistant soft wheat varieties compared to a susceptible wheat cultivar, and 2) to determine if resistance was accounted for entirely by the predicted stacked traits.

MATERIAL AND METHODS

Plant material, experimental conditions and herbicide treatments

The HR wheat lines Rados and Helter, each with multiple resistance to imazamox and glufosinate (IMA + GLU), came from the crossing the glufosinate resistant T-590 line (IAS/CSIC-Cordoba, Spain) with the Clearfield® Pantera cultivar resistant to imazamox (INIA-Carillanca, Chile). The Pantera cultivar has the Ser-653-Asn mutation in the *ALS-imi1* and *ALS-imi2* genes.¹⁵ The T-590 line contains the *bar* gene from pACH25 plasmid, which encodes the PAT enzyme.¹⁸

Seeds from the T-590 x Pantera cross (F_1 progeny) were sown in 15 cm Petri dishes containing two layers of filter paper moistened with 10 mL distilled water and sealed with parafilm. They were maintained until germination in a growth chamber at 26/16 °C (day/night), photoperiod of 14/10 h, a light density of 850 mmol m⁻² s⁻¹, and 60% relative humidity. Seedlings were transplanted in 250 mL pots (one plant per pot) containing a mixture of peat and sand (1:1), and kept in the growth chamber under the same conditions.

Fifty wheat plants with 3-4 true leaves were treated with 40 g active ingredient (ai) ha⁻¹ of imazamox (Pulsar® 40, 4% w/v, BASF Española S. L.). Dash HC® adjuvant (methyl oleate methyl palmitate, 34.8% w/v, BASF Española S. L.) was added at a dose of 1.25 L ha⁻¹ when imazamox was applied. Six hours later, plants were treated again with 750 g ai ha⁻¹ of glufosinate (Finale®, 15% w/v, Bayer Hispania S.L.). Applications were conducted using a treatment chamber (Devries Manufacturing, Hollandale, MN, USA) equipped with a TeeJet 8002EVS flat fan nozzle calibrated at 250 kPa to deliver 250 L ha⁻¹ of application volume a height of 50 cm.

F_1 individuals surviving herbicide application 21 days after treatment (DAT) were selected to be self-pollinated in order to obtain non-segregant lines. Two lines (Rados and Helter) with the best traits (height, spikes, grains, tillering, etc.) were multiplied by self-pollinating for five generations.¹⁹ Twenty plants of each line were sown in 3L pots (four plants per pot) and treated with IMA + GLU (40 + 750g ai ha⁻¹) as described above. The Spanish cultivar Gazul, a high quality commercial variety susceptible (S) to both herbicides, was

1
2
3 106 included as control. No segregation was observed after herbicide application, and their
4 107 herbicide resistance mechanisms were characterized.
5
6
7 108 **Imazamox and glufosinate dose-response**
8 109 Wheat plants (individualized in 250 mL pots) of Rados, Helter and Gazul with 3-4 true
9 110 leaves were treated with imazamox and glufosinate, alone or in sequential applications. When
11 111 the herbicides were applied separately, the imazamox doses were: 0, 20, 40, 80, 120, 160, 200
12 112 and 240 g ai ha⁻¹ for the R plants, and 0, 2.5, 5, 10, 20 and 30 g ai ha⁻¹ for the S plants; and the
13 113 glufosinate doses were: 0, 200, 400, 600, 800, 1000 and 1200 g ai ha⁻¹ for the R plants; and 0, 5,
14 114 10, 50, 100 and 200 g ai ha⁻¹ for the S plants. In the sequential applications [glufosinate was
15 115 applied first and 6 hours later imazamox (situation 1), and vice versa (situation 2)], the doses of
16 116 IMA + GLU: 0 + 0, 20 + 200, 40 + 400, 60 + 600, 80 + 800, 100 + 1000 and 120 + 1200 g ai ha⁻¹
17 117 for the R lines; and 0 + 0, 0.25 + 2.5, 1 + 10, 20 + 200 and 30 + 300 g ai ha⁻¹ for the S cultivar.
18 118 Dash HC* was added at 1.25 L ha⁻¹ in all treatments of imazamox. Herbicide applications were
19 119 conducted as described above. The plants were cut at ground level 21 DAT and weighed to
20 120 determinate the fresh weight. The experiments had a completely randomized design with 10
21 121 replications per dose, and they were repeated twice.
22
23 122 **Foliar herbicide retention**
24 123 Wheat plants at 3-4 true leaves were treated with a solution containing 40 + 750 g ai
25 124 ha⁻¹ of IMA + GLU, respectively, + 1.25 L ha⁻¹ of Dash HC* + 100 mg L⁻¹ Na-fluorescein in the
26 125 same conditions of the dose-response assays.²⁰ Na-fluorescein was used as a labeling reagent
27 126 to determine the amount of herbicide solution retained. After treatment, once the herbicide
28 127 solution from the leaves was dried (20-25 min), the plants were cut at ground level and shaken
29 128 vigorously for 30 s in Erlenmeyer containing 50 mL of 5 mM NaOH. The washing solution was
30 129 recovered in glass flasks and the fluorescein absorbance was immediately measured at
31 130 490_{exc}/510_{em} nm (Hitachi F-2500 spectrofluorimeter). The tissues were stored in paper
32 131 envelopes and dried in an oven at 80 °C for 72 h. Seven plants of each line or cultivar were
33 132 used in a completely random design. Retention was expressed as µL of herbicide solution (IMA
34 133 + GLU) per g of dry matter.
35
36 134 **Enzyme activity of ALS and GS assays**
37 135 Six grams (separated into two aliquots of three grams) of tissues from the youngest
38 136 expanded leaves per wheat line were taken and immediately powdered using liquid N₂.
39 137 ALS enzyme activity was determined with three grams (first aliquot) per wheat line
40 138 following the methodology described by Hatami et al.²¹ Technical grade imazamox (2-(4-

139 isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-methoxymethylnicotinic acid, 96.5% purity,
140 Sigma Aldrich, Spain) concentrations 0, 1, 10, 50, 100, 200, 300, 400 and 500 μ M were used.
141 Absorbance of samples was measured with a spectrophotometer (Beckman DU-640, Fullerton,
142 CA, USA) at 520 nm. The total content of the extracted protein in the ALS raw extract was
143 measured using the kit No. P5656 (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) following the manufacturer's
144 instructions at 595 nm in the spectrophotometer.

145 GS activity was determined *in vitro* using three grams (second aliquot) of the three
146 wheat lines.¹⁷ Technical grade glufosinate [(RS)-2-Amino-4-(hydroxyl(methyl)phosphonyl)
147 butanoic acid], (95% purity, Sigma Aldrich, Spain) concentrations 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200
148 and 300 μ M were used. Absorbance of samples was measured in the spectrophotometer at
149 540 nm. The total content of the extracted protein in the GS experiment was measured using
150 the colorimetric method of Bradford. The GS specific activity (nmol of glutamine mg^{-1} of
151 protein h^{-1}) was determined in the absence of herbicide.

152 The experiments (ALS and GS assays) were repeated three times.

153 ALS sequencing

154 Leaf tissues (± 100 mg per sample) of Rados, Helter and Gazul were taken for DNA
155 extraction using the Speed tools DNA Extraction Kit Cat Plant (Biotools B & M Labs, S.A). The
156 primer pair AHAS21Fwd/AHAS26Rev,²² were used to amplify a 617 bp-length fragment. The
157 polymerase chain reaction (PCR) reactions were set up with Certamp complex enzyme mix
158 (Biotools B&M Labs, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. PCR products (5
159 μ L) were digested with the restriction enzyme Msp I (Invitrogen, CA, USA) to try to identify
160 three expected ALS alleles (*imi3*, *imi1* and *imi2*-ALS genes from genomes A, B or D,
161 respectively) of the catalytic subunit present in wheat varieties.²² Both PCR and digestion
162 products were resolved on 1% agarose gels and viewed under UV light. Ten PCR products of
163 each allele and each wheat line/cultivar were sequenced by Sanger technology. ALS sequences
164 were assembled³⁴ and compared with the ALS sequences of wheat accessions *imi1*-AY210407,
165 *imi2*-AY210408 and *imi3*-AY273827 from GenBank.

166 Ammonia accumulation

167 Fifty mg of leaf discs (5 mm in diameter) from the youngest fully expanded leaves were
168 placed in 1.5 mL tubes with 200 μ L of different technical grade glufosinate concentrations (0,
169 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 and 300 μ M) diluted in the sucrose/Tween 20 medium. The tubes
170 were sealed with two layers of micropore tape and placed in an incubation chamber at 18 °C
171 under 150 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of light intensity for 24 h, and 60% relative humidity. Ammonia

172 accumulation in R and S wheat plants was conducted according to leaf disc method described
 173 by Dayan et al.²³ The absorbance of samples was measured with a spectrophotometer at 630
 174 nm. The experiments were repeated twice assessing three samples per glufosinate
 175 concentration (each one with three replicates) of each wheat line. Ammonia content was
 176 determined using ammonium chloride as a standard (Sigma Aldrich, Spain). Data of ammonia
 177 accumulation were expressed as percentage in relation to the control.

178 **Absorption and translocation**

179 Absorption and translocation tests of each herbicide were carried out separately. Both
 180 imazamox and glufosinate labeled with ¹⁴C were mixed with their respective commercial
 181 formulation (Pulsar® 40 and Finale®, respectively) to prepare a solution with a specific activity
 182 of 0.834 kBq µl⁻¹. The final concentrations corresponded to 40 g ai ha⁻¹ of imazamox (+ 1.25 L
 183 ha⁻¹ of Dash HC) and 750 g ai ha⁻¹ of glufosinate into 250 L ha⁻¹. Treated plants (1 µL herbicide
 184 solution corresponding to 0.834 kBq plant⁻¹) at 3-4 true leaves were handled according to
 185 Hatami et al.²¹ Five plants per wheat line were harvested at 3, 6, 12, 24, 48, and 96 h after
 186 treatment (HAT) for imazamox, and at 6, 12, 24, 48 and 72 HAT for glufosinate in a completely
 187 random design. Radioactivity was analyzed by liquid scintillation spectrometry in a Beckman LS
 188 6500 scintillation counter (Beckman Coulter Inc. Fullerton, USA). The percentage of each
 189 radiolabeled herbicide absorbed was expressed as [kBq in combusted tissue / (kBq in
 190 combusted tissue + kBq in leaf washes)] × 100.

191 The translocation of both ¹⁴C-herbicides was also visualized. Wheat plants, treated as
 192 described above, were harvested at the same periods indicated for each herbicide (three
 193 plants per line each time). Whole plants were washed, placed on filter paper (25 x 12.5 cm),
 194 dried at room temperature for 4 days, and exposed on a phosphor plate for 6 h to visualize the
 195 ¹⁴C-herbicide using a Phosphor Imaging (Cyclone, Perkin Elmer, Packard Bioscience BV). a
 196 phosphor imager (Cyclone, Packard Bioscience BV).

197 **Statistical analysis**

198 Data of fresh weight reduction and enzyme activity assays were expressed as
 199 percentage in relation to the control, and subjected to non-linear regression analysis to
 200 determine the dose of imazamox and/or glufosinate needed to reduce the fresh weight (GR₅₀)
 201 and to inhibit enzyme (ALS or GS) activity (I₅₀) by 50% for each soft wheat line, using the log-
 202 logistic equation: $Y = c + \frac{(d-c)}{1 + (x/g)^b}$; ²⁴ where Y is the percentage of fresh weight or the
 203 enzyme activity (ALS or GS) reduction with respect to the control, c and d are the lower and
 204 upper asymptotes, b is the slope of the curve at the inflection point, g the herbicide dose at

the inflection point, and x is the herbicide dose (independent variable). Regression analyses were conducted using the *drc* package with program R version 3.2.5, and plotted using SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc. USA).

Absorption and translocation of ^{14}C -herbicides data was subjected to ANOVA. When required, the Tukey HSD test at 5% probability was used to separate means using the Statistix software version 9.0 (Analytical Software, USA).

RESULTS

Dose-response

Resistance to imazamox and glufosinate was confirmed in the R wheat lines. Rados and Helter showed higher resistance level to these herbicides when they were applied separately (Table 1). The R lines, with similar susceptibility to glufosinate, were ≈ 17 times more resistant than Gazul (Figure 1A). For Imazamox, Rados and Helter were 26.4 and 40.1 times, respectively, more resistant than the S cultivar (Figure 1B). Sequential applications caused an antagonistic effect on R and S plants, being higher when glufosinate was applied first (Table 1). In the latter situation, Gazul showed GR_{50} values of 19.2 and 1.9 g ai ha $^{-1}$ for glufosinate and imazamox, respectively, being 19.0 and 28.1 times more sensitive than Rados and Helter, respectively (Figure 1C). When imazamox was applied first, the GR_{50} values of Gazul were 3.4 and 34.3 g ai ha $^{-1}$ for imazamox and glufosinate, respectively, being 14.5 and 19.7 times more sensitive than Rados and Helter, respectively (Figure 1D).

Foliar retention

The foliar retention (IMA + GLU) showed no differences between wheat lines ($P=0.1862$, $DF=2$, $n=21$). The average retention of herbicide solution retained was 228 ± 37 , 214 ± 32 , and 196 ± 27 $\mu\text{L g}^{-1}$ dry weight for Helter, Rados and Gazul, respectively.

Enzyme activity tests

The specific *in vitro* activities of the ALS enzyme for Rados, Helter and Gazul were 279 ± 23 , 294 ± 42 and 284 ± 28 nmol acetoin mg $^{-1}$ protein h $^{-1}$, respectively, with no significant differences ($P=0.2647$, $DF=2$, $n=72$). Imazamox inhibited the ALS activity in all cultivars as the concentrations increased (Figure 2A). The amount of imazamox needed to inhibit ALS enzyme activity of the S cultivar Gazul by 50% (I_{50}) was 8.7 μM . The RF of Rados and Helter lines were 16.4 and 24.7, respectively, compared to Gazul (Table 2).

The specific *in vitro* activities of GS enzyme for Rados, Helter and Gazul were 390 ± 46 , 443 ± 33 , and 421 ± 62 nmol of glutamine mg $^{-1}$ protein h $^{-1}$, respectively, with no significant

238 differences ($P=0.3486$, $DF=2$, $n=72$). Glufosinate inhibited the GS activity in all cultivars as the
239 concentrations increased (Figure 2B). The amount of glufosinate to inhibit the GS activity by
240 50% (I_{50}) ranged from 15.7 to 21.1 μM . According to the 95% confidence intervals (CI), there
241 were no significant differences between R and S wheat lines (Table 2).

242 ALS sequencing

243 The predicted amino acid sequences of Gazul (S cultivar) were presented as the same
244 consensus of with the ALS sequences of wheat accessions from GenBank (*imi1*-AY210407,
245 *imi2*-AY210408 and *imi3*-AY273827, respectively). The line Helter presented the Ser-653-
246 Asn mutation in the *imi1*- and *imi2*-ALS genes, meanwhile the line Rados presented the same
247 mutation only in the *imi2*-ALS gene. The codon changes were AAC to AGC. No mutation was
248 found in the *imi3* gene (Figure 3).

249 3.5 Ammonia accumulation

250 The S and lines accumulated ammonia at different levels. From 0 to 100 μM of
251 glufosinate, the ammonia accumulation was similar among them. However, Gazul, the S wheat
252 line, showed the highest ammonium accumulation ($365 \pm 88 \mu\text{g}$ of ammonia per g fresh
253 weight) at 300 μM of glufosinate. At this glufosinate concentration, Helter and Rados
254 accumulated at least 60% less ammonia than Gazul (Figure 4).

255 Absorption and translocation

256 Greater than 50% of ^{14}C -imazamox was absorbed within 3 HAT for all cultivars. Initially
257 (from 3 to 12 HAT), the R lines absorbed higher amounts of herbicide than the S cultivar Gazul,
258 but from 24 HAT no differences were observed in the absorption between R and S wheat lines,
259 with all showing ^{14}C -imazamox higher than 90% absorption (Figure 5A). The R and S wheat
260 plants showed high rates of ^{14}C -imazamox translocation from the treated leaf to the rest of the
261 plant and roots. In the first 3 to 12 HAT, the ^{14}C -imazamox was mainly retained in the treated
262 leaf, but from 24 HAT, extensive translocation was observed to rest of plant and roots (Figure
263 5C). At 96 HAT, the ^{14}C -imazamox amount, quantified in each evaluated section of the plant,
264 was similar between the wheat lines, ranging from 30 to 40% (Figure S1).

265 The foliar ^{14}C -glufosinate absorption rates were lower than 40%. Differences in
266 translocation rates were observed except at 12 HAT. The two R lines absorbed slightly higher
267 herbicide than the S cultivar (Figure 5B). The R and S plants showed low translocation rates of
268 ^{14}C -glufosinate with no differences among lines, with the majority of herbicide (> 75%)
269 retained on the treated leaf (Figure 5D). The ^{14}C -glufosinate amounts translocated to the rest
270 of the plant and roots were lower than 15 and 10%, respectively (Figure S1).

DISCUSSION

Effective weed management without herbicide use is not currently viable in conventional intensive wheat production systems.³ In this work two new R wheat lines, with stacked traits conferring multiple resistance to imazamox and glufosinate, to contribute to this objective have been characterized.

Rados and Helter lines presented acceptable resistance levels to both herbicides, even when they were applied in sequence. Field doses of imazamox and glufosinate range from 20 to 60 and from 450 to 750 g ai ha⁻¹, respectively, according to the manufacturers (BASF and Bayer CropScience, respectively). The estimated GR₅₀ values for the R lines were included in the recommended dose ranges of glufosinate, and the estimated GR₅₀ values of imazamox were above them. The differences between the wheat R lines may be due to the differential susceptibility to imazamox as will be discussed later. The antagonistic effects observed on wheat plants in the sequential applications, were due to additivity effects of both herbicides.²⁵ The rapid action of glufosinate, damaging chloroplast and photosynthesis structures,¹³ caused more severe intoxication of wheat plants when it was first applied. On the contrary, when imazamox was applied first, a slightly slower action herbicide but very rapid absorption and translocation,²⁶ the phytotoxic effects of glufosinate were mitigated. Therefore, we do not recommend sequential application of these herbicides during the same crop season, because was evident that the R wheat lines are more resistant when exposed to these herbicides separately, facilitating the rotation of herbicides between crop seasons. This practice and the correct use of HR crops may contribute to mitigating the increasing problems with herbicide resistant weeds.⁷

The arrangement of trichomes and amount of cuticular waxes contribute to a greater or lesser foliar retention of herbicide solution^{27,28}. These parameters were not studied in the wheat lines because R and S plants presented similar foliar retention, suggesting that these parameters did not play an important role in the multiple resistance to imazamox and glufosinate of Rados and Helter. In addition, differences in foliar retention of imazamox solution were observed among wheat cultivars/lines, susceptible or resistant, but this retention did not influence the resistance levels.²⁹

The similar specific ALS and GS activities of the wheat lines (both R and S) in absence of herbicides (imazamox and glufosinate, respectively), suggested that the overexpression of both ALS and GS enzymes was not involved in the multiple resistance to imazamox and glufosinate of Rados and Helter.

The greater I₅₀ of ALS enzyme in the R wheat lines, Rados and Helter, evidenced alterations in the target site. This suggests that the ALS-*imi1* and ALS-*imi2* resistant genes with

the mutations Ser-653-Asn from the imazamox-resistant cultivar Pantera (parent),¹⁵ were transferred to the R wheat lines. Differences in imazamox susceptibility between the R lines, as demonstrated in ALS gene sequencing, were due to that Helter acquiring both resistant genes (ALS-*imi1* and ALS-*imi2*) from Pantera, while Rados only acquired one of them (ALS-*imi2*). Generally, Clearfield® crops only carry the mutation in the ALS-*imi2* gene, which is enough to confer resistance to imazamox^{16,30} at field recommended doses (40 g ia ha⁻¹). Similar differences in imazamox susceptibility were observed in Clearfield® wheat cultivars¹⁴⁻¹⁶ and other Clearfield® crops,³⁰ carrying the single and/or double mutation in the *imi1*-ALS and *imi2*-ALS genes, respectively.

In glufosinate, the substitution His-249-Tyr in the GS-encoding gene was responsible for conferring resistance in glufosinate-resistant soybean cell,³¹ and the Asp-171-Asn substitution was proposed as responsible for resistance to this herbicide in *Lolium perenne* ssp. *multiflorum*.³² However, the similar susceptibility of the GS to glufosinate in wheat plants R and S, suggested that there are no mutations in the GS gene involved in the resistance of Helter and Rados to this herbicide.

The high accumulation of ammonia observed in Gazul, the S cultivar, showed a rapid inhibition of GS activity by glufosinate in this cultivar. Ammonia accumulation is a direct response of the susceptibility grade of the GS enzyme to glufosinate toxicity.³² The lesser ammonia accumulation in R-wheat lines indicates that GS activity was not impaired by glufosinate. This was due to the rapid acetylation of the glufosinate to N-acetyl-glufosinate (non-toxic compound,) mediated by the PAT enzyme.¹³ This enzyme is encoded by the *bar* gene, that comes from the glufosinate-resistant parent, the line T-590 line.^{17,38} These results are in agreement with those observed in *Lolium perenne*, where the inhibition of the enzymatic activity of GS between plants R and S was similar, but the accumulation of ammonia was higher in plants R.³³ In addition, the application of glufosinate causes low ammonia accumulation in glufosinate-resistant rice,³⁴ *Lolium perenne* ssp. *multiflorum*³² and cotton,¹³ showing a strong relationship between dose response and ammonia accumulation. Helter and Rados also showed a strong relationship of these parameters.

The R and S wheat lines presented high absorption and translocation patterns of ¹⁴C-imazamox. During the first HAT (from 3 to 12 HAT) there were differences of absorption between wheat lines. This parameter was higher in R than in S wheat plants during this period, but the translocation of ¹⁴C-imazamox was similar between them during the evaluation period (from 3 to 96 HAT). Reduced absorption and translocation can play an important role in the resistance to other herbicides such as glyphosate,^{35,36} but in the resistance to ALS-inhibiting

herbicides this role is secondary.¹¹ This suggested that these non-target site mechanisms were not involved in the resistance to imazamox of these R wheat lines.

Contrary to imazamox, the absorption and translocation patterns of ¹⁴C-glufosinate were lower, because this herbicide has low or no mobility due to its rapid phytotoxicity in the source leaf tissue.^{26,37} This explain the low amounts of glufosinate absorbed and translocated in the R and S wheat plants. The limited translocation of ¹⁴C-glufosinate can be a consequence of the combined effects of ammonia accumulation, reduced carbon accumulation, and depletion of glutamine.^{17,26,38} These processes occurred rapidly in plants S killing their leaf tissues, explaining why these plant presented lower absorption and translocation rates of ¹⁴C-glufosinate in comparison with plants R. Therefore, the absorption and translocation of these herbicide were not involved in the resistance to glufosinate of the R wheat lines.

CONCLUSIONS

The R wheat lines, Rados and Helter, showed high resistance levels to imazamox and glufosinate. The resistance to both herbicides in these wheat lines were due to alterations in the target site, revealed by the ALS enzyme activity assays in the case of imazamox; and rapid deactivation of glufosinate to N-acetyl-glufosinate mediated by the PAT enzyme. These stacked traits were obtained from their respective glufosinate- and imazamox-resistant parents.

The resistance of Rados and Helter is higher when exposed to these herbicides independently, facilitating the rotation of herbicides. Therefore, these R lines are an effective weed management tool for wheat production, and they can also contribute to mitigating the increasing problem of herbicide resistant weeds.

Acknowledgements:

This study was supported by Projects AGL 2016-78944-R (Spain) and CONACYT-242088 (Mexico). The authors would thank BASF International (Frankfurt, Germany) and Dr. C. Gauvrit (INRA-Dijon, France) for delivery ¹⁴C-imazamox and ¹⁴C-glufosinate, respectively, as well as Rafael Roldan for his assistance with the experiments, and the Dr. Antonio P. Martín from the Plant Breeding research group of the Institute for Sustainable Agriculture, IAS-CSIC, Cordoba, Spain, by the obtainment of Rados and Helter.

371 REFERENCES

- 372 1. FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017). FAO cereal supply
373 and demand brief. Available at: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>
374 (accessed November 12, 2017).
- 375 2. Rojano-Delgado AM, Priego-Capote F, Luque de Castro MD, De Prado R. Mechanism of
376 imazamox resistance of the Clearfield® wheat cultivar for better weed control. *Agron.*
377 *Sustain. Dev.* **35**:639–648 (2015).
- 378 3. Jabran K, Mahmood K, Melander B, Bajwa AA, Kudsk P. Weed dynamics and management
379 in wheat. *Adv. Agron.* **145**:97–166 (2017).
- 380 4. Bonny S. Genetically modified herbicide-resistant crops, weeds, and herbicides: Overview
381 and impact. *Environ. Manage.* **57**:31–48 (2016).
- 382 5. Green JM. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Manag. Sci.*
383 **70**:1351–1357 (2014).
- 384 6. Green JM. The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. *Pest Manag.*
385 *Sci.* doi: 10.1002/ps.4462 (2016).
- 386 7. Lamichhane JR, Devos Y, Beckie HJ, Owen MKD, Tillie P, Messean A, et al. Integrated weed
387 management systems with herbicide-resistant crops in the European Union: Lessons
388 learnt from home and abroad. *Crit. Rev. Biotechnol.* **37**:459–475 (2017).
- 389 8. Gressel J, Gassmann AJ, Owen MDK. How well will stacked transgenic pest/herbicide
390 resistances delay pests from evolving resistance? *Pest Manag. Sci.* **73**:22–34 (2017).
- 391 9. Shaner DL, Beckie HJ. The future for weed control and technology. *Pest Manag. Sci.*
392 **70**:1329–1339 (2014).
- 393 10. Beckie HJ, Harker KN. Our top 10 herbicide-resistant weed management practices. *Pest*
394 *Manag. Sci.* **73**:1045–1052 (2017). doi:
- 395 11. Yu Q, Powles SB. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest*
396 *Manag. Sci.* **70**:1340–1350 (2014).
- 397 12. Everman WJ, Burke IC, Allen JR, Collins J, Wilcut JW. Absorption, translocation, and
398 metabolism of ¹⁴C-glufosinate in glufosinate-resistant corn, goosegrass (*Eleusine indica*),
399 large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*), and sicklepod (*Senna obtusifolia*). *Weed Sci.* **57**:1–5
400 (2009).
- 401 13. Carbonari CA, Latorre DO, Gomes GL, Velini ED, Owens DK, Pan Z, et al. Resistance to
402 glufosinate is proportional to phosphinothricin acetyltransferase expression and activity in
403 LibertyLink® and WideStrike® cotton. *Planta* **243**:925–933 (2016).

- 404 14. Domínguez-Méndez R, Alcántara-de la Cruz R, Rojano-Delgado AM, Fernández-Moreno
405 PT, Aponte R, De Prado R. Multiple mechanisms are involved in new imazamox-resistant
406 varieties of durum and soft wheat. *Sci. Rep.* 7:14839 (2017).
- 407 15. Jimenez F, Rojano-Delgado AM, Fernández PT, Rodríguez-Suárez C, Atienza SG, De Prado
408 R. Physiological, biochemical and molecular characterization of an induced mutation
409 conferring imidazolinone resistance in wheat. *Physiol. Plant.* 158:2–10 (2016).
- 410 16. Pozniak CJ, Hucl PJ. Genetic analysis of imidazolinone resistance in mutation-derived lines
411 of common wheat. *Crop Sci.* 44:23–30 (2004).
- 412 17. Rojano-Delgado AM, Priego-Capote F, Barro F, Luque de Castro MD, De Prado R. Liquid
413 chromatography–diode array detection to study the metabolism of glufosinate in *Triticum*
414 *aestivum* T-590 and influence of the genetic modification on its resistance.
415 *Phytochemistry* 96:117–122 (2013).
- 416 18. León E, Marín S, Giménez MJ, Piston F, Rodríguez-Quijano M, Shewry PR, et al. Mixing
417 properties and dough functionality of transgenic lines of a commercial wheat cultivar
418 expressing the 1Ax1, 1Dx5 and 1Dy10 HMW glutenin subunit genes. *J. Cereal Sci.* 49:148–
419 156 (2009).
- 420 19. Barro F, Barcelo P, Lazzeri PA, Shewry R, Martín A, Ballesteros J. Field evaluation and
421 agronomic performance of transgenic wheat. *Theor. Appl. Genet.* 105:980–984 (2002).
- 422 20. Gauvrit C. Glyphosate response to calcium, ethoxylated amine surfactant, and
423 ammonium sulfate. *Weed Technol.* 17:799–804 (2003).
- 424 21. Hatami ZM, Gharekhloo J, Rojano-Delgado AM, Osuna MD, Alcántara R, Fernández P, et
425 al. Multiple mechanisms increase levels of resistance in *Rapistrum rugosum* to ALS
426 herbicides. *Front. Plant Sci.* 7:169 (2016).
- 427 22. Pozniak CJ, Birk IT, O'Donoghue LS, Ménard C, Hucl PJ, Singh BK. Physiological and
428 molecular characterization of mutation-derived imidazolinone resistance in spring wheat.
429 *Crop Sci.* 44:1434–1443 (2004).
- 430 23. Dayan FE, Owens DK, Corniani N, Silva FML, Watson SB, Howell J, et al. Biochemical
431 markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. *Weed*
432 *Sci.* 63:23–63 (2015).
- 433 24. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-response analysis using R. *PLoS ONE*
434 10:e0146021 (2015).
- 435 25. Cedergreen N. Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within
436 environmental toxicology. *PLoS ONE* 9:e96580 (2014).
- 437 26. Rojano-Delgado AM, Menendez J, De Prado R. Absorption and penetration of herbicide
438 viewed in metabolism studies: Case of glufosinate and imazamox in wheat in *Retention*,

- 1
- 2
- 3 439 uptake, and translocation of agrochemical in plants, ed. by Myung K, Satchivi NM,
- 4 440 Kingston CK, ACS Publications, Washington, pp. 159–165 (2014).
- 5
- 6 441 27. Alcántara-de la Cruz, R, Barro F, Domínguez-Valenzuela JA, De Prado R. Physiological,
- 7 442 morphological and biochemical studies of glyphosate resistance in Mexican cogonilla
- 8 443 (*Coloanania broussonetii* (Balb.) DC.). *Plant Physiol. Biochem.* **98**:72–80 (2016).
- 9
- 10 444 28. Yao C, Myung K, Wang N, Jhoson A. Spray retention of crop protection agrochemicals on
- 11 445 the plant surface in wheat in *Retention, uptake, and translocation of agrochemical in*
- 12 446 *plants*, ed. by Myung K, Satchivi NM, Kingston CK, ACS Publications, Washington, pp. 1–22
- 13 447 (2014).
- 14
- 15 448 29. Jiménez F, Fernández P, Rojano-Delgado AM, Alcantara R, De Prado R. Resistance to
- 16 449 imazamox in Clearfield soft wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Prot.* **78**:15–19 (2015).
- 17
- 18 450 30. Lee H, Rustgi S, Kumar N, Burke I, Yenish JP, Gill KS, et al. Single nucleotide mutation in the
- 19 451 barley acetohydroxy acid synthase (AHAS) gene confers resistance to imidazolinone
- 20 452 herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**:8909–8913 (2011).
- 21
- 22 453 31. Pornprom T, Prodmattee N, Chatchawankanphanich O. Glutamine synthetase mutation
- 23 454 conferring target-site-based resistance to glufosinate in soybean cell selections. *Pest*
- 24 455 *Manag. Sci.* **65**:216–222 (2009).
- 25
- 26 456 32. Avila-García WV, Sanchez-Olguin E, Hulting AG, Mallory-Smith C. Target-site mutation
- 27 457 associated with glufosinate resistance in Italian ryegrass (*Lolium perenne* L. ssp.
- 28 458 *multiflorum*). *Pest Manag. Sci.* **68**:1248–1254 (2012).
- 29
- 30 459 33. Avila-Garcia WV, Mallory-Smith C. Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne*)
- 31 460 populations also exhibit resistance to glufosinate. *Weed Sci.* **59**:305–309 (2010).
- 32
- 33 461 34. Tsai CJ, Wang CS, Wang CY. Physiological characteristics of glufosinate resistance in rice.
- 34 462 *Weed Sci.* **54**:634–640 (2006).
- 35
- 36 463 35. Shaner DL. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Sci.*
- 37 464 **57**:118–23 (2009).
- 38
- 39 465 36. Domínguez-Valenzuela JA, Gharekhloo J, Fernández-Moreno PT, Cruz-Hipólito HE,
- 40 466 Alcántara-de la Cruz R, Sánchez-González E, et al. First confirmation and characterization
- 41 467 of target and non-target site resistance to glyphosate in Palmer amaranth (*Amaranthus*
- 42 468 *palmeri*) from Mexico. *Plant Physiol. Biochem.* **115**:212–218 (2017)
- 43
- 44 469 37. Jalaludin A, Yu Q, Zoellner P, Beffa R, Powles SB. Characterisation of glufosinate resistance
- 45 470 mechanisms in *Eleusine indica*. *Pest Manag. Sci.* **73**:1091–1100 (2017).
- 46
- 47 471 38. Beriault JN, Horsman GP, Devine MD. Phloem transport of D, L-glufosinate and acetyl-L-
- 48 472 glufosinate in glufosinate-resistant and -susceptible *Brassica napus*. *Plant Physiol.*
- 49 473 **121**:619–628 (1999).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Dose-response curves of different soft wheat lines, treated with imazamox and glufosinate (alone or in sequential applications) evaluated at 21 days after treatment. A and B) Application of herbicides separately. Sequential applications (second herbicide application was conducted 6 h after the first one): C) the glufosinate was applied first, and D) imazamox was applied first. Vertical bars \pm standard error ($n=10$).

Figure 2. Log-logistic curves of enzymatic activity of the (A) acetolactate synthase (ALS) and (B) glutamine synthase (GS) in susceptible and resistant soft wheat plants. Vertical bars \pm standard error ($n=3$).

Figure 3. Partial alignment of *imi*-ALS genes sequences in susceptible and resistant soft wheat plants. Highlighted letters indicate the Ser-653 position corresponding to the point mutation associated with the conferring of resistance to imazamox. Red letters indicate a codon change from AAC (serine = S) to AGC (asparagine = N).

Figure 4. Accumulation of ammonia (%) at different concentrations (μM) of glufosinate in susceptible and resistant soft wheat plants. Vertical bars \pm standard error ($n=3$).

Figure 5. Absorption of ^{14}C -imazamox (A) and ^{14}C -glufosinate (C) from 3 to 96 h after treatment (HAT) and from 6 to 72 HAT, respectively, in susceptible and resistant soft wheat plants. Vertical bars represent \pm standard error ($n=5$). Digital and autoradiograph images of ^{14}C -imazamox (B) and ^{14}C -glufosinate (D) translocation at 96 HAT. The red color indicates a higher concentration of ^{14}C -herbicide. Arrows indicate the treated leaf.

Supplementary figures

Figure S1. Translocation (from percentage of ^{14}C -herbicide absorbed) of ^{14}C -imazamox and ^{14}C -glufosinate in susceptible and resistant soft wheat plants. Vertical bars represent \pm standard errors ($n=5$).

Table 1. Parameters of the sigmoidal equations¹ used to estimate the dose (g ai ha⁻¹) of imazamox and glufosinate, alone or sequential applications, needed to reduce the fresh weight by 50% (GR₅₀) in susceptible and resistant soft wheat plants

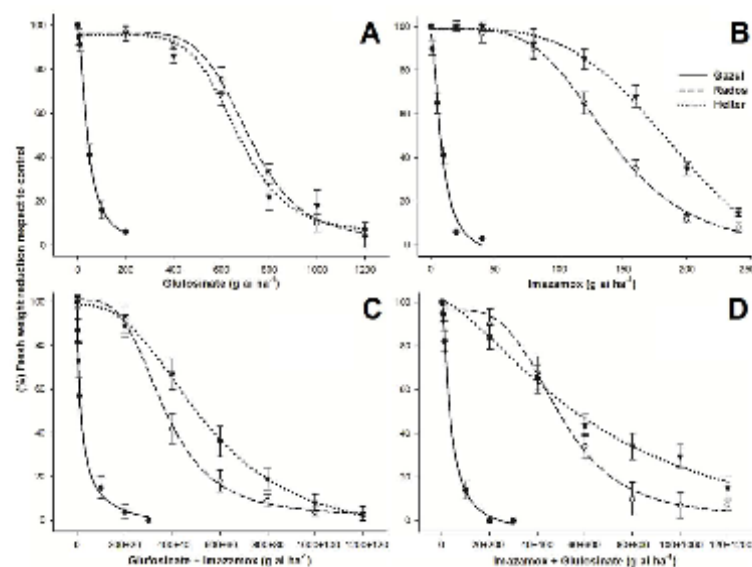
Cultivar/Line	GR ₅₀ (CI95%) ²	c	d	b	R ² aj	RF ³
Application of herbicides separately						
Glufosinate						
Gazul	40.8 (4.7)	-0.61	98.87	1.71	0.99	–
Rados	713.5 (28.5)	2.79	96.85	6.66	0.99	17.5
Helter	668.1 (49.2)	5.42	95.59	6.51	0.96	16.4
Imazamox						
Gazul	5.3 (1.8)	1.67	96.45	1.71	0.97	–
Rados	139.8 (21.7)	2.34	98.94	4.40	0.99	26.4
Helter	212.3 (35.4)	-1.24	99.03	3.88	0.99	40.1
Sequential applications ⁴						
Glufosinate was applied first (GLU + IMA)						
Gazul	19.2 (4.2) + 1.9 (0.4)	-1.13	100.98	0.87	0.98	–
Rados	365.5 (62.1) + 36.5 (6.2)	1.88	100.94	3.55	0.99	19.0
Helter	539.7 (96.8) + 53.4 (9.7)	2.31	98.69	2.36	0.99	28.1
Imazamox was applied first (IMA + GLU)						
Gazul	3.4 (0.8) + 34.3 (7.5)	-1.39	99.37	1.38	0.99	–
Rados	49.2 (8.3) + 492.5 (82.9)	1.44	96.70	3.84	0.98	14.5
Helter	67.1 (12.1) + 671.2 (121.7)	1.45	100.11	1.50	0.95	19.7

¹ $Y=c+[(d-c)/(1+(x/g)^b)]$ where; Y= percentage of fresh weight with respect to the control, c = lower limit, d = upper limit, b = Hill's slope, R² aj = 1 – (sums of squares of the regression / corrected total sums of squares), g = herbicide dose at the inflection point (i.e. GR₅₀), and x=herbicide dose. ²CI values are the 95% confidence intervals (n=10). ³RF = Resistance factor = GR₅₀R/GR₅₀S. ⁴Second herbicide application was conducted 6 h after the first one.

Table 2. Parameters of the sigmoidal equation^a used to estimate the concentrations (μM) of imazamox and/or glufosinate needed to inhibit the enzymatic activity of the ALS and GS by 50% (I_{50}), respectively in susceptible and resistant soft wheat plants

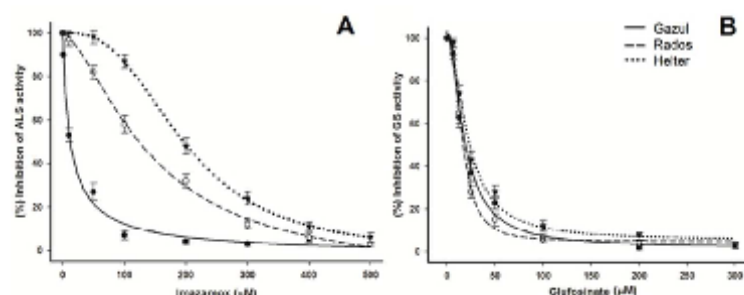
Cultivar/Line	I_{50} (CI95%) ²	c	d	b	R^2 aj	RF ³
Imazamox						
Gazul	8.7 (3.6)	-2.3	99.9	0.86	0.99	
Rados	142.3 (17.4)	-1.2	99.6	1.56	0.99	16.4
Helter	214.6 (23.5)	-1.2	100.1	2.75	0.99	24.7
Glufosinate						
Gazul	18.0 (4.7)	1.9	102.2	1.66	0.98	
Rados	15.7 (5.1)	4.8	101.7	2.37	0.99	0.9
Helter	21.1 (7.2)	1.7	103.0	1.75	0.98	1.2

¹ $Y=c+[(d-c)/(1+(x/g)^b)]$ where; Y= percentage of enzyme activity with respect to the control, c = lower limit, d = upper limit, b = Hill's slope, R^2 aj = 1 - (sums of squares of the regression / corrected total sums of squares), g= herbicide concentration at the inflection point (i.e. I_{50}), and x=herbicide concentration. ²CI values are the 95% confidence intervals ($n=3$). ³RF = Resistance factor = $I_{50}R/I_{50S}$.



Dose-response curves of different soft wheat lines, treated with imazamox and glufosinate (alone or in sequential applications) evaluated at 21 days after treatment. A and B) Application of herbicides separately. Sequential applications (second herbicide application was conducted 6 h after the first one): C) the glufosinate was applied first, and D) imazamox was applied first. Vertical bars \pm standard error ($n=10$).

105x79mm (300 x 300 DPI)



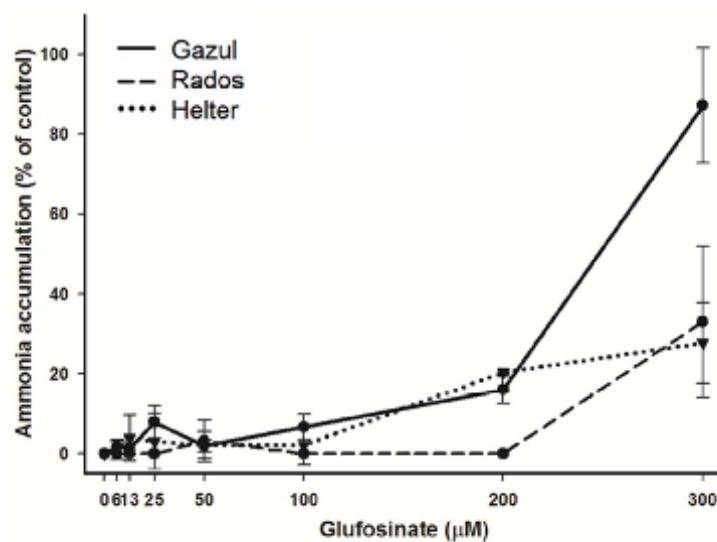
Log-logistic curves of enzymatic activity of the (A) acetolactate synthase (ALS) and (B) glutamine synthase (GS) in susceptible and resistant soft wheat plants. Vertical bars \pm standard error ($n=3$).

55x21mm (300 x 300 DPI)

<i>Amino acid position</i>	650	660
<i>Imi1</i> -AY210407	PHQEHVLP MIP S GGAFKDMIMEGD	
<i>Imi2</i> -AY210408	PHQEHVLP MIP S GGAFKDMIMEGD	
<i>Imi3</i> -AY273827	PHQEHVLP MIP S GGAFKDMIMEGD	
<i>Imi1</i> -Gazul	PHQEHVLP MIP S GGAFKDMIMEGD	
<i>Imi2</i> -Gazul	PHQEHVLP MIP S GGAFKDMIMEGD	
<i>Imi3</i> -Gazul	PHQEHVLP MIP S GGAFKDMIMEGD	
<i>Imi1</i> -Rados	PHQEHVLP MIP S GGAFKDMIMEGD	
<i>Imi2</i> -Rados	PHQEHVLP MIP N GGAFKDMIMEGD	
<i>Imi3</i> -Rados	PHQEHVLP MIP S GGAFKDMIMEGD	
<i>Imi1</i> -Helter	PHQEHVLP MIP N GGAFKDMIMEGD	
<i>Imi2</i> -Helter	PHQEHVLP MIP N GGAFKDMIMEGD	
<i>Imi3</i> -Helter	PHQEHVLP MIP S GGAFKDMIMEGD	

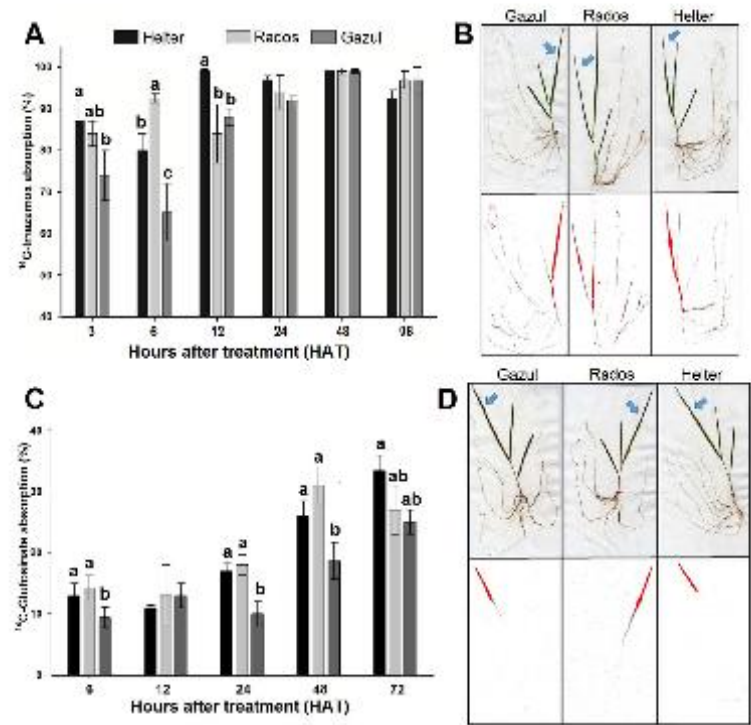
Partial alignment of *imi*-ALS genes sequences in susceptible and resistant soft wheat plants. Highlighted letters indicate the Ser-653 position corresponding to the point mutation associated with the conferring of resistance to imazamox. Red letters indicate a codon change from AAC (serine = S) to AGC (asparagine = N).

70x46mm (300 x 300 DPI)



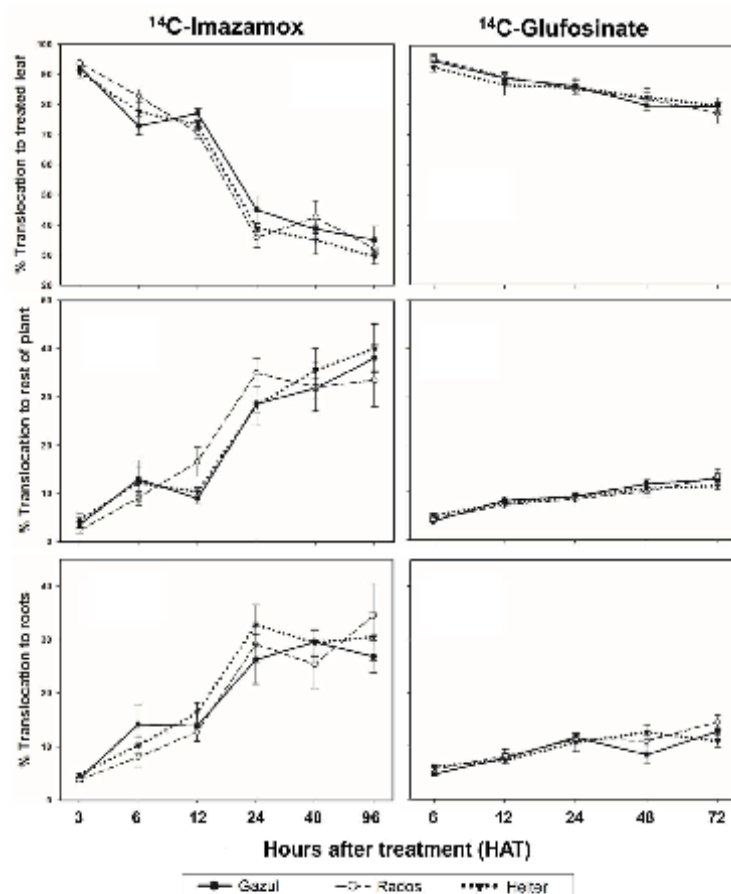
Accumulation of ammonia (%) at different concentrations (μM) of glufosinate in susceptible and resistant soft wheat plants. Vertical bars \pm standard error ($n=3$).

49x35mm (300 x 300 DPI)



Absorption of ^{14}C -imazamox (A) and ^{14}C -glufosinate (C) from 3 to 96 h after treatment (HAT) and from 6 to 72 HAT, respectively, in susceptible and resistant soft wheatplants. Vertical bars represent \pm standard error ($n=5$). Digital and autoradiograph images of ^{14}C -imazamox (B) and ^{14}C -glufosinate (D) translocation at 96 HAT. The red color indicates a higher concentration of ^{14}C -herbicide. Arrows indicate the treated leaf.

140x133mm (300 x 300 DPI)



170x207mm (300 x 300 DPI)

CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITAE

Domínguez Méndez, Rafael

DNI: 14636497-X

Fecha de nacimiento: 22/10/1986

Sexo: Hombre

Nacionalidad: España

C. Autón./Reg. de nacimiento: Andalucía

Provincia de contacto: Córdoba

Dirección de contacto: Sta. M^a Trassierra 58 Bl. 3, 1^o-A

Código postal: 14011

Teléfono fijo: (+34) 957226690

Correo electrónico: rafadominguezmendez@gmail.com

Teléfono móvil: (+34) 680600110

Situación profesional actual

Nombre de la entidad: Universidad de Córdoba **Tipo de entidad:** Universidad

Departamento, servicio, etc.: Química Agrícola, Facultad de Ciencias

Categoría/puesto o cargo: Contratado

Fecha de inicio: 2012

Modalidad del contrato: Contratado con cargo a proyecto de investigación.

Tipo de dedicación: Tiempo completo

Titulación universitaria

1 Titulación oficial: Titulado Superior

Nombre del título: Licenciado en Ciencias Ambientales

Entidad que expide el título: Universidad de Córdoba

Fecha de titulación: 2010

2 Titulación oficial: Tesis de Licenciatura

Nombre del título: Influencia de subproductos obtenidos durante un proceso de concentrado proteico en trigo de secano.

Entidad que expide el título: Universidad de Córdoba

Fecha de titulación: 2012

3 Titulación oficial: Máster Universitario

Nombre del título: Máster en Cambio Global: Recursos Naturales y Sostenibilidad

Entidad que expide el título: Universidad de Córdoba

Fecha de titulación: 2013

4 Titulación oficial: Doctorado

Nombre del título: Trigo Clearfield® y gramíneas (*L. rigidum*) resistentes a imidazolinonas: Aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares.

Entidad que expide el título: Universidad de Córdoba

Fecha de titulación: Actualmente

Actividad docente

Como Colaborador honorario (certificado por la Universidad de Córdoba)

Asignatura: Gestión del Medio Físico (3º curso Grado en Ciencias Ambientales).
Curso Académico: 2016/2017.

Actividad científica o tecnológica

Participación en proyectos de I+D+i financiados en convocatorias competitivas de Administraciones o entidades públicas y privadas

1 Denominación del proyecto: Desarrollo de Agroquímicos Biológicos a partir de Subproductos del Olivar.

Entidad de realización: Universidad de Córdoba

Fecha de inicio: 2016 **Fecha fin:** 2018

2 Denominación del proyecto: Aprovechamiento Biotecnológico de Subproductos del Olivar en Andalucía

Entidad de realización: Universidad de Córdoba

Fecha de inicio: 2012 **Fecha fin:** 2015

3 Denominación del proyecto: Aprovechamiento agronómico de la levadura de cerveza. Heineken España S. A. y la corporación tecnológica de Andalucía.

Entidad de realización: Universidad de Córdoba

Fecha de inicio: 2008 **Fecha fin:** 2011

Producción científica

Publicaciones. Artículos en revistas internacionales

- 1 Domínguez-Méndez, R., Alcántara-De la Cruz, R., Fernández-Moreno, P., Aponte, R., De Prado, R. (2017). Multiple mechanism are involved in new imazamox-resistant varieties of durum and soft wheat. Scientific Reports 7(1); 14839.
- 2 Domínguez-Méndez, R., Alcántara-De la Cruz, R., Rojano-Delgado, A. M., Martins da Silveira, H., Portugal, J., Cruz-Hipolito, H. E., De Prado, R. (2017). Stacked traits conferring multiple resistance to imazamox and glufosinate in soft wheat. Enviado para su publicación.

Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales

1 Título: Efecto antigerminativo de hidroxitirosol obtenido de residuos de orujera sobre *Lolium* spp (vallico)

Nombre del congreso: XXXIX Jornadas de viticultura y enología de tierra de barros

Ciudad de realización: Almendralejo, Extremadura, España.

Fecha de realización: 2017

Entidad organizadora: Centro Universitario Santa Ana. Universidad de Extremadura. Rafael Domínguez Méndez; Bruno Alcalá González; José Luis González Fernández.

2 Título: Comportamiento de Glifosato en suelos: Revisión Bibliográfica

Nombre del congreso: XXI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas y XXXIV Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza.

Ciudad de realización: Cancún, Quintana Roo, México

Fecha de realización: 2013

Entidad organizadora: Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM)

Rafael Domínguez Méndez; M^a Concepción Benítez Camacho; José Luis González Fernández.

3 Título: Efecto de la aplicación de fenoxiácidos herbicidas sobre la actividad microbiana del suelo

Nombre del congreso: XXI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas y XXXIV Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza.

Ciudad de realización: Cancún, Quintana Roo, México

Fecha de realización: 2013

Entidad organizadora: Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM)

Rafael Domínguez Méndez; M^a Concepción Benítez Camacho; José Luis González Fernández.

4 Título: Efecto del abono de *Vicia villosa* sobre las malas hierbas y el rendimiento de algodón

Nombre del congreso: XXI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas y XXXIV Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza

Ciudad de realización: Cancún, Quintana Roo, México

Fecha de realización: 2013

Entidad organizadora: Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM)

S. Batooei; J. Gherekhloo; B. Kamkar; Rafael Domínguez Méndez; A. M. Rojano; Rafael De Prado Amián.

5 Título: Influencia de a utilización de una solución p-k en el abonado de trigo duro

Nombre del congreso: 6º Congreso SODIAF 2013: Desarrollo Humano e Innovación Tecnológica para Enfrentar el Cambio Climático Hacia la Competitividad.

Fecha de realización: 2013

Entidad organizadora: SODIAF

Rafael Domínguez Méndez; Aurelio Criado; M. C Benítez Camacho; J. L. González Fernández.

6 Título: Influencia de la aplicación de fenoxiácidos herbicidas en actividades enzimáticas de un suelo

Nombre del congreso: XXI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas y XXXIV Congreso Mexicano de la Ciencia de la Maleza

Ciudad de realización: Cancún, Quintana Roo, México

Fecha de realización: 2013

Entidad organizadora: Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM)

Rafael Domínguez Méndez; M^a Concepción Benítez Camacho; José Luis González Fernández.

7 Título: Utilización de orujos de aceituna como abono

Nombre del congreso: 6º Congreso SODIAF 2013: Desarrollo Humano e Innovación Tecnológica para Enfrentar el Cambio Climático Hacia la Competitividad

Ciudad de realización: San Pedro de Macorís, Reino Unido

Fecha de realización: 2013

Ciudad: República Dominicana

Aurelio Criado; Rafael Domínguez Méndez; M. C. Benítez Camacho; J. L. González Fernández.

8 Título: Glyphosate-resistant *Parthenium hysterophorus* L., in Colombia

Nombre del congreso: International workshop on Glyphosate weed resistance: European status and solution

Fecha de realización: 2012

J. Rosario; F. Jiménez; R. Domínguez.

9 Título: The impact of the use of Glyphosate on the biological properties of soil: A review

Nombre del congreso: International workshop on Glyphosate weed resistance: European status and solution

Ciudad de realización: Córdoba, España

Fecha de realización: 2012

Rafael Domínguez Méndez; Concepción Benítez Camacho; José Luis González Fernández.

Otros Méritos

1 Colaborador honorario del Departamento de Química Agrícola y edafología de la Universidad de Córdoba. (2018).

2 Desarrollo de patente de invención en colaboración con el CSIC (2016).

3 Curso de agricultura de conservación, desarrollo rural y condicionalidad (2008). Universidad de Córdoba.

